



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**Análises comparativas citogenética e do DNA mitocondrial em
Parauchenipterus galeatus Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae)
coletados no Alto rio Paraná, no Alto rio São Francisco e no rio Piumhi: um
enfoque biogeográfico.**

Roberto Laridondo Lui

**SÃO CARLOS
2010**

**Análises comparativas citogenética e do DNA mitocondrial em
Parauchenipterus galeatus Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae)
coletados no Alto rio Paraná, no Alto rio São Francisco e no rio Piumhi: um
enfoque biogeográfico.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**Análises comparativas citogenética e do DNA mitocondrial em
Parauchenipterus galeatus Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae)
coletados no Alto rio Paraná, no Alto rio São Francisco e no rio Piumhi: um
enfoque biogeográfico.**

Roberto Laridondo Lui

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética e
Evolução da Universidade Federal de
São Carlos, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Evolução.**

**Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira
Filho**

**SÃO CARLOS
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L952ac

Lui, Roberto Laridondo.

Análises comparativas citogenética e do DNA mitocondrial em *Parauchenipterus galeatus* Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae) coletados no Alto rio Paraná, no Alto rio São Francisco e no rio Piumhi : um enfoque biogeográfico / Roberto Laridondo Lui. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
118 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Citogenética de peixes. 2. DNA mitocondrial. 3. Transposição de águas - Piumhi, Rio. 4. Cromossomo B. I. Título.

CDD: 597.087322 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISES COMPARATIVAS CITOGENÉTICA E DO DNA
MITOCONDRIAL EM PARAUCHENIPTERUS GALEATUS
BLEEKER, 1862, (SILURIFORMES, AUCHENIPTERIDAE)
COLETADOS NO ALTO RIO PARANÁ, NO ALTO RIO
SÃO FRANCISCO E NO RIO PIUMHI: UM ENFOQUE
BIOGEOGRÁFICO.**

Dissertação de Mestrado de Roberto Laridondo Lui

Banca Examinadora

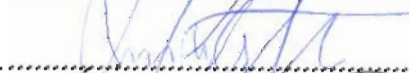
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



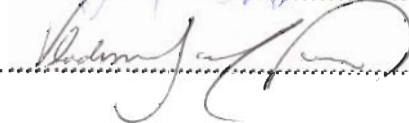
Prof. Dr. Alberto José Prioli



Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo



Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido



Dedico aos meus pais
Célia e Roberto

AGRADECIMENTOS

Agradeço à (ao)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida permitindo que pudesse me dedicar exclusivamente às atividades de pesquisa relacionadas a esse trabalho.

Universidade Federal de São Carlos pela estrutura cedida durante esses últimos dois anos para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução e aos professores a ele credenciados por toda ajuda quando necessária.

Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelos auxílios regulares também importantes para manutenção do laboratório de pesquisa desenvolvimento das atividades de campo.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis pela licença de coleta concedida. Ao Instituto Estadual de Floresta pelo apoio nas coletas realizadas no estado de Minas Gerais.

Professor Orlando Moreira Filho pela confiança, liberdade de trabalho, orientação, amizade e apoio dado durante esses dois anos, possibilitando não só a realização desse e outros trabalhos, mas por também ter me mostrado que a formação durante um curso de pós-graduação pode ir além de disciplinas e desenvolvimento de um projeto de pesquisa.

Professor Vladimir Pavan Margarido por continuar fazendo parte de minha formação acadêmica, acreditando sempre em meu potencial. Também pela amizade, conselhos, confiança e paciência durante todos esses anos.

Professor Luiz Antonio Carlos Bertollo por estar sempre pronto a ajudar com discussões, correções de trabalhos, idéias, além das valiosas contribuições que ainda serão feitas como membro da banca.

Professor Alberto José Prioli pela ajuda na análise das seqüências de DNA mitocondrial e pelas valiosas correções que ainda serão feitas na dissertação.

Minha família, meus pais Roberto, Célia e minha irmã Rafaela, que mesmo distantes, sempre estiveram diferentemente torcendo e acreditando que este e tantos outros momentos importantes de minha vida iriam chegar. Carrego comigo cada um dos princípios e exemplos que sempre se preocuparam em passar para mim.

Minha namorada Tatiana pelo amor, paciência, companheirismo e apoio dado durante este período, a qual vem fazendo a diferença em cada conquista de minha vida.

Tantos outros familiares que estiveram e com certeza continuarão sempre torcendo pelo meu sucesso. Entre eles, um obrigado especial as minhas avós Irene e Terezinha.

Amigos da Citogenética (Daniel, Eli, Josi, Ju, Marcelo), pela ajuda e por compartilharem durante estes dois anos muitos bons momentos dentro e fora do laboratório e que com certeza não esquecerei.

Técnicos da citogenética, Piau e Gallo, pela ajuda nas coletas e no dia a dia de nosso laboratório, sem contar as valiosas cervejinhas, brigas e boas risadas que demos junto em vários momentos.

Aos outros colegas dos laboratórios do departamento de Genética e Evolução e outros departamentos, que prefiro não citar nomes para não esquecer de alguém, pelas valiosas discussões de trabalho, ajudas e momentos de descontração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Bacia do Paraná	1
1.2. Bacia do São Francisco	3
1.3. Transposição do rio Piumhi.....	4
1.4. Ordem Siluriformes.....	5
1.5. Família Auchenipteridae	6
1.6. Estudos Citogenéticos em Auchenipteridae	8
1.7. DNA Mitocondrial	8
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO PROJETO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Pontos de Coleta Amostrados	14
3.2. Tratamento <i>in vivo</i>	15
3.3. Tratamento <i>in vitro</i>	16
3.4. Indução do aumento do número de mitoses	17
3.5. Classificação dos cromossomos	18
3.6. Bandamento C.....	18
3.7. Caracterização das Regiões Organizadoras de Núcleo	19
3.8. Análise Sequencial	19
3.9. Coloração pelo Fluorocromo CMA ₃ e DAPI	20
3.10. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	20
3.11. Análises Cariótípicas.....	22
3.12. Extração e Quantificação de DNA	22
3.13. Amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial	23
3.14. Sequenciamento e alinhamento das sequências	23
4. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS).....	25
Capítulo I - Primeira descrição de cromossomos B na família Auchenipteridae, <i>Parauchenipterus galeatus</i> (Siluriformes) da bacia do rio São Francisco (MG)	34
Resumo.....	35
Introdução	35

Materiais e Métodos.....	43
Resultados	44
Discussão.....	46
Agradecimentos.....	52
Referências.....	52
Anexos.....	63
Capítulo II - Caracterização cromossômica de três populações de <i>Parauchenipterus galeatus</i> (Siluriformes, Auchenipteridae) no Brasil	66
Resumo.....	67
Introdução	68
Materiais e Métodos.....	70
Resultados	72
Discussão.....	75
Agradecimentos.....	82
Referências.....	83
Anexos.....	90
Capítulo III - Análise da região controle do mtDNA de populações de <i>Parauchenipterus galeatus</i> (Siluriformes, Auchenipteridae) de três bacias hidrográficas.....	93
Resumo.....	94
Introdução	96
Materiais e Métodos.....	98
Resultados	100
Discussão.....	103
Agradecimentos.....	107
Referências Bibliográficas	108
Anexos.....	113
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
ANEXO I	118

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 Mapas da região de transposição do rio Piumhi (a) antes e (b) depois da construção da Hidroelétrica de FURNAS. A seta indica o canal de transposição05

Figura 2 Esquema da molécula de DNA mitocondrial de vertebrados10

Materiais e Métodos

Figura 1 Mapa dos pontos de coleta amostrados, (Quadrado) bacia do rio São Francisco, Lagoa da Prata - MG, (Triângulo) bacia do rio Piumhi, Capitólio - MG, (Losango) bacia do rio Paraná, Três Lagoas - MS15

Figura 2 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus*. Comprimento total = 15,6 centímetros15

Capítulo I

Figura 1 Metáfase de *Parauchenipterus galeatus* tratada pelo bandamento C corada com (a) iodeto de propídeo, (b) convertida para escala de cinza e (c) invertida. Barra = 5 μ m.....63

Figura 2 Cariótipo de *Parauchenipterus galeatus* (a) corado com Giemsa e (b) através do bandamento C. Par cromossômico portador das Ag-RONs (Box). Barra = 5 μ m63

Figura 3 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* coradas com Giemsa (a, c) e seqüencialmente através do bandamento C (b, d). As setas indicam os cromossomos B. Barra = 5 μ m.....64

Figura 4 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* coradas (a) pela Cromomicina A₃ e (b) pelo DAPI; as setas indicam o par (23) portador das RONS que possui heterocromatina GC-rica, sendo confirmada pelo DAPI; as cabeças de seta mostram os cromossomos B. Metáfases hibridizadas com (c) sonda de rDNA 18S e (d) sonda de rDNA 5S; as setas indicam o par (23) portador rDNA 18S e o par (16) portador rDNA 5S, respectivamente. Barra = 5 μ m65

Capítulo II

- Figura 1** Mapa dos pontos de coleta amostrados, (Quadrado) bacia do rio São Francisco, Lagoa da Prata - MG, (Triângulo) bacia do rio Piumhi, Capitólio - MG, (Losango) bacia do rio Paraná, Três Lagoas – MS.....90
- Figura 2** Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* das populações dos rios São Francisco (a, b), Piumhi (c, d) e Paraná (e, f) corados com Giemsa (a, c, e) e através do bandamento C (b, d, f). No Box são visualizados os cromossomos portadores das Ag-RONs e cromossomos B das respectivas populações.....91
- Figura 3** Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* hibridizados com sonda de rDNA 5S das populações do rio São Francisco (a), Piumhi (b) e Paraná (c). Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* hibridizadas com sonda de rDNA 18S das populações dos rios São Francisco (d), Piumhi (e) e Paraná (f)92

Capítulo III

- Figura 1** Locais de coleta de *Parauchenipterus galeatus* nas bacias do rio São Francisco (Quadrado), Piumhi (Triângulo) e Paraná (Losango).....113
- Figura 2** Amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial de todos os indivíduos da população da bacia do rio São Francisco corridos em gel de agarose 1%. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb da Invitrogen113
- Figura 3** Amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial de todos os indivíduos das populações da bacia do rio Piumhi e Paraná, corridos em gel de agarose 1%. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb da Invitrogen114
- Figura 4** Árvore de distância Neighbor-Joining. Os números presentes nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.....114

LISTA DE TABELAS

Materiais e Métodos

Tabela 1 Pontos de coleta amostrados de <i>Parauchenipterus galeatus</i> do presente trabalho	14
--	----

Capítulo I

Tabela 1 Revisão de cromossomos B em <i>catfishes</i>	38
Tabela 2 Frequência de cromossomos B em <i>Parauchenipterus galeatus</i> da bacia do São Francisco.....	45

Capítulo II

Tabela 1 Dados citogenéticos de diferentes populações de <i>Parauchenipterus galeatus</i>	79
---	----

Capítulo III

Tabela 1 Dados referentes aos pontos de coleta de <i>Parauchenipterus galeatus</i>	98
Tabela 2 Sítios polimórficos dos 50 exemplares de <i>Parauchenipterus galeatus</i> das populações do São Francisco (SF), Piumhi (P) e Paraná (PA).....	102
Tabela 3 Distância genética entre as três populações de <i>P. galeatus</i> analisadas.....	103

RESUMO

A ictiofauna de água doce correspondente ao território brasileiro representa aproximadamente 55% das espécies na região Neotropical, compreendendo cerca de 2.500 espécies, distribuídas em 39 famílias e pertencentes a nove ordens. Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical, possuindo 20 gêneros e cerca de 90 espécies. Nesta família, *Parauchenipterus* apresenta ampla distribuição, ocorrendo por toda América do Sul, estando presente nas bacias do Paraná-Paraguai, Amazônica, Orenoco, Guianas, São Francisco e Leste do Brasil. *Parauchenipterus galeatus* ocorre em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, como Amazonas, Prata e São Francisco. O presente trabalho caracterizou através de técnicas de citogenética básica e molecular, e o seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial três populações de *P. galeatus* das bacias dos rios Paraná, São Francisco e uma região de provável conexão natural (antigo Pantanal do Cururu) e artificial (transposição do rio Piumhi) entre essas duas bacias. Dessa forma, buscou-se investigar qual possível origem da população de *P. galeatus* presente na região de transposição, além dos possíveis efeitos que essa ação antrópica poderia causar para espécie em estudo. O número diplóide igual a 58 cromossomos se manteve constante entre as populações, entretanto, variações na fórmula cariotípica foram detectadas (São Francisco, $22m+16sm+12st+8a$; Piumhi, $20m+16sm+14st+8a$; Paraná, $24m+18sm+8st+8a$). Na população do rio São Francisco foi detectado a presença de cromossomos supranumerários. Esses cromossomos B são pequenos, metacêntricos, totalmente heterocromáticos e possuem variação numérica intra e interindividual. A heterocromatina está localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos, com marcação bitelomérica em alguns cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e

subtelocêntricos, e pequenos blocos pericentroméricos em alguns cromossomos acrocêntricos nas três populações. Ag-RONs apresentaram-se simples no braço curto de um par subtelocêntrico nas três populações, variando apenas o par portador deste sítio. Hibridização com sonda de rDNA 18S confirmou o par cromossômico evidenciado pelo nitrato de prata nas três populações. Os sítios de rDNA 5S estão localizados em dois pares cromossômicos submetacêntricos em posição intersticial no braço curto/longo de cada um deles nas três populações, variando apenas os pares portadores destas seqüências. Foi obtido um fragmento de 847 pares de bases através do seqüenciamento da região *D-loop* do DNA mitocondrial das três populações com um total de 65 sítios polimórficos. Os marcadores cromossômicos (clássicos e moleculares) e análise da região controle do DNA mitocondrial mostraram que a população do rio Piumhi possivelmente já existia nesta bacia antes de ocorrer essa transposição. Tal proposição é baseada nas diferenças cromossômicas entre as populações dessas diferentes bacias e nas diferenças nas seqüências de DNA mitocondrial. Além da detecção de haplótipos exclusivos de cada população para região *D-loop*. As seqüências da região controle do DNA mitocondrial indicam forte estruturação populacional devido ao índice de fixação molecular calculado e ao fato de que cada população apresenta haplótipos exclusivos, o que sugere a ausência de fluxo gênico entre elas. Além disso, as diferenças cromossômicas mostram maior similaridade entre São Francisco e Piumhi do que em relação à população do rio Paraná. A distância genética detectada entre as populações através das seqüências do DNA mitocondrial também reforçam essa maior proximidade entre São Francisco e Piumhi. Isto indica que possivelmente essas duas populações divergiram mais recentemente do que quando comparada à população do rio Paraná. A população presente na região de transposição apresentou apenas um haplótipo detectado, o que indica a ausência de diversidade genética. Sugere-se no presente

trabalho, que esta baixa diversidade seja decorrente de um possível gargalo populacional com posterior diminuição do tamanho efetivo de uma população que possivelmente habitava um antigo pantanal (do Cururu) presente nessa região de transposição. Dessa forma, os marcadores cromossômicos e a análise molecular, aliados ao contexto histórico natural de formação de bacias hidrográficas, aspectos ecológicos da espécie, isolamento geográfico de populações entre as bacias hidrográficas e dentro de uma mesma bacia foram considerados para discutir as possíveis relações biogeográficas entre populações de *P. galeatus* de diferentes localidades.

ABSTRACT

The Brazilian freshwater ichthyofauna corresponds nearly 55% of species at Neotropical zone, including about 2.500 species grouped in 39 families and belonging to nine orders. Auchenipteridae comprises 20 genera and 90 species. *Parauchenipterus* presents a widely distribution, occurring across South América, appearing at Paraná-Paraguai, Amazônia, Orenoco Guianas and São Francisco basin, and Brazil's East. *Parauchenipterus galeatus* occurs in different Brazilian basins, as Amazon, Prata and São Francisco. The present study describes through basic and molecular cytogenetic, and the sequence of mitochondrial DNA control region, three populations of *Parauchenipterus galeatus* from Paraná and São Francisco basin, and a probable natural (Wetland of Cururu) and artificial (Piumhi river transposition) connections between this two basins. The diploid number was equal to 58 chromosomes for the three populations; however, variations at the karyotype formula where detected (São Francisco, 22m+16sm+12st+8a; Piumhi, 20m+16sm+14st+8a; Paraná, 24m+18sm+8st+8a). At São Francisco population supernumerary chromosomes where detected. These B-chromosomes are small, metacentric, totally heterochromatics and have numeric variation intra and interindividual. The heterochromatin is located in terminal position from almost all chromosomes, and some metacentric, submetacentric, and subtelocentric chromosomes presents bitelomeric marks, and small pericentromeric blocks in some acrocentric chromosomes, occurring at the three populations. Ag-NORs presented simple at the short arm in an acrocentric pair from all populations, changing only the pair containing this site. *In situ* hybridization with rDNA 18S probes confirm the chromosome pair evidenced by Ag-NOR in all three populations. The rDNA 5S sites are interstitials, located in two submetacentric chromosome pairs, occurring at

short/long arms in all three populations, changing only the pair containing this site. A 847 base pair fragment was amplified through *D-loop* sequence region from mitochondrial DNA in the three populations, presenting 65 polymorphic sites. The chromosome markers (classic and molecular) and mitochondrial DNA control region analysis shown that Piumhi river population probably already exists at this basin before the transposition. This proposing is based at the chromosome differences between those populations from different basins and mitochondrial DNA sequences, besides the detection of exclusive haplotypes of *D-loop* from each populations. The control sequences of DNA mitochondrial indicates a strong populational structuring, due to the fixation of molecular table of contents calculated and the fact that each population presents exclusive haplotypes, wich suggests the absence of genic flood among them. However, the chromosome differences show a bigger similarity between São Francisco and Piumhi than Paraná river population. The genetic distance detected among this population trthrough the mitochondrial DNA sequences reinforces this nearness between São Francisco and Piumhi. This indicates that possibly this population diverge more recently when compared to Paraná river. The population located on the transposition region presented just one haplotype detected, which indicates the absence of genetic diversity. The present study suggests that, this low diversity is current of a possible population bottle neck with posterior effective size reducing of a population that probably habitats an old wetland (of Cururu) presents at this tansposition region. At the present study, the classic and molecular chromosome markers, allied to the natural basin formation historic context, ecological species aspects, geographic isolation between the basins and into the same basin were used to discuss the biogeographical possible relationship among the *Parauchenipterus galeatus* populations from different locations.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacia do Paraná

A bacia do Prata, que é formada principalmente pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, drena uma região de aproximadamente 3,2 milhões de km² na América do Sul, ocupando 10,5% do território brasileiro. Atravessa quatro países: Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e caracteriza-se por ser a segunda maior bacia Sul-Americana, ficando atrás somente da bacia Amazônica. No Brasil, atravessa dois estados da região Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás), dois da região Sudeste (São Paulo, Minas Gerais) e todos os estados da região Sul (IBAMA, 2007a).

O rio Paraná é o principal rio da bacia do Prata e o décimo maior do mundo em descarga (IBAMA, 2007a). Como segundo maior rio da América do Sul, percorre aproximadamente 4.695 km desde sua nascente na confluência do rio Grande e Paranaíba até o rio da Prata, dos quais 3.809 km dentro do território brasileiro drenando uma região de 891.000 km². As nascentes da bacia do Alto rio Paraná correspondem à região onde o rio Grande inicia o seu curso, na Serra da Mata da Corda - MG (Agostinho & Júlio Jr., 1999; IBAMA, 2007a).

A bacia do Paraná é composta por tributários de porte significativo, como se pode observar ao longo de seu percurso pelos rios Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema e Iguaçu, entre outros (Agostinho & Júlio Jr., 1999; IBAMA, 2007a). Os rios Grande e Paranaíba, que são caracterizados como rios de planalto se juntam na região de Três Lagoas - MS para formar o rio Paraná (Agostinho & Júlio Jr., 1999; Agostinho *et al.*, 2004; IBAMA, 2007a).

No Brasil, a bacia do Paraná é dividida em duas regiões: o Alto Paraná, que vai da sua nascente até a usina de Itaipu; e o Baixo Paraná, que corresponde à região posterior a essa barragem (Agostinho *et al.*, 2004). Com a formação do reservatório de Itaipu em 1982 na bacia do rio Paraná ocorreu a inundação da antiga região de Sete Quedas que se caracterizava por separar duas ictiofaunas distintas, a acima e abaixo dessas cachoeiras. A formação do reservatório de Itaipu deslocou essa barreira 150 quil metros abaixo e permitiu que espécies até o momento restritas a região abaixo de Sete Quedas pudessem se dispersar para o Alto Paraná. Devido à falta de um abrangente levantamento ictiofaun stico anterior a essa inundação, não   possível diagnosticar com certeza quantas espécies ascenderam esse trecho (Agostinho & Júlio Jr., 1999).

O trecho brasileiro da bacia do Paraná possui uma grande diversidade ictiofaunística com cerca de 250 espécies, das quais 107 são Characiformes, 91 Siluriformes, 20 Perciformes, 3 Rajiformes, 1 Cyprinodontiformes e 1 Pleuronectiformes, sem contabilizar as possíveis novas espécies que ainda necessitam de comprovação científica (Agostinho & Júlio Jr., 1999). Em um levantamento realizado por Bonetto (1986) foram encontradas apenas 130 espécies; essa grande diferenç  deve estar relacionada à expansão do Alto Paraná através da construção de Itaipu permitindo a subida de peixes acima da região de Sete Quedas, que estavam restritos ao então médio Paraná. Outro importante fator deve ser a maior quantidade de levantamento de peixes realizados nessa bacia, principalmente em outros locais como córregos e riachos (Agostinho & Júlio Jr., 1999). Entre as pelo menos dezessete espécies que possivelmente ascenderam esse trecho (Agostinho & Júlio Jr., 2002), *Parauchenipterus galeatus*, também se estabeleceu acima da região de Sete Quedas após a construção do reservatório de Itaipu (Graça & Pavanelli, 2007).

1.2. Bacia do São Francisco

A bacia do São Francisco caracteriza-se por ser a única exclusivamente brasileira drenando uma região de 631.133 km² que corresponde a 7,4% do território nacional. Está distribuída entre os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Goiás e Distrito Federal sendo a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil (Sato & Godinho, 2004).

O rio São Francisco inicia seu curso no Planalto de Araxá, correspondendo às nascentes do rio Samburá, e sua foz no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas, percorrendo cerca de 2.863 km (Silva *et al.*, 2003) e apresentando um desnível de aproximadamente 1.600 metros (Sato & Godinho, 1999). Esse rio é dividido em quatro regiões: Alto São Francisco, que vai das nascentes até Pirapora-MG; Médio São Francisco, que vai de Pirapora até Remanso-BA; Sub-médio São Francisco, que vai de Remanso até a cachoeira de Paulo Afonso; e Baixo São Francisco, que vai de Paulo Afonso até sua foz (Sato & Godinho, 1999; IBAMA, 2007b). Contém 36 tributários de porte significativo, dos quais apenas 19 são perenes, e estão presentes em sua maioria no Alto São Francisco, enquanto as outras regiões são caracterizadas por possuir afluentes temporários (Sato & Godinho, 1999; IBAMA, 2007b).

Quanto à sua ictiofauna, que se apresenta semelhante às bacias Amazônica e do Prata, já foram identificadas aproximadamente 150 espécies nativas (Sato & Godinho, 1999; IBAMA, 2007b). Para a ordem Siluriformes já foram identificadas 71 espécies na bacia do São Francisco representando 12 famílias, e Auchenipteridae é a terceira família mais significativa contribuindo com 6 espécies (*Glanidium albescens*, *Parauchenipterus galeatus*, *Parauchenipterus leopardinus*, *Pseudauchenipterus flavescens*, *Pseudauchenipterus nodosus*, *Pseudotatia parva*) (Sato & Godinho, 1999).

1.3. Transposição do rio Piumhi

A Hidrelétrica de Furnas que foi a primeira usina de grande porte do Brasil fez parte de um projeto que tinha por objetivo sanar a crise energética em meados da década de 50, que ameaçava os três maiores centros socioeconômicos brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte). Essa usina, que teria a capacidade de gerar 1.216 MW de energia, teve suas obras iniciadas em julho de 1958 e começou efetivamente a operar em setembro de 1963 (Moreira-Filho & Backup, 2005; FURNAS, 2007). Está localizada entre os municípios de São José da Barra e São João Batista, no estado de Minas Gerais (Moreira-Filho, 2006).

A construção da Hidrelétrica de Furnas no rio Grande, apesar de fundamental para o desenvolvimento da região Centro-Oeste na época, traria uma grave consequência quando as comportas da usina fossem fechadas para a formação do reservatório de Furnas. O volume de água da represa atingiria uma quantidade que seria capaz de alagar parte da cidade de Capitólio e fazer com que essa água escoasse por essa região até conectar a bacia do São Francisco a bacia do Paraná (Moreira-Filho, 2006). Com o objetivo de evitar esses problemas foi proposta a construção de um dique próximo a cidade de Capitólio, que conteve as águas do reservatório de Furnas e acabou represando as águas de um afluente da margem direita do rio Grande, o rio Piumhi. Para solucionar esse novo problema foi feito um canal de aproximadamente 18 km na porção média do rio Piumhi, desviando-o para o córrego Água Limpa que deságua na margem esquerda do rio Ribeirão Sujo, um afluente do rio São Francisco (Moreira-Filho & Backup, 2005; Moreira-Filho, 2006).

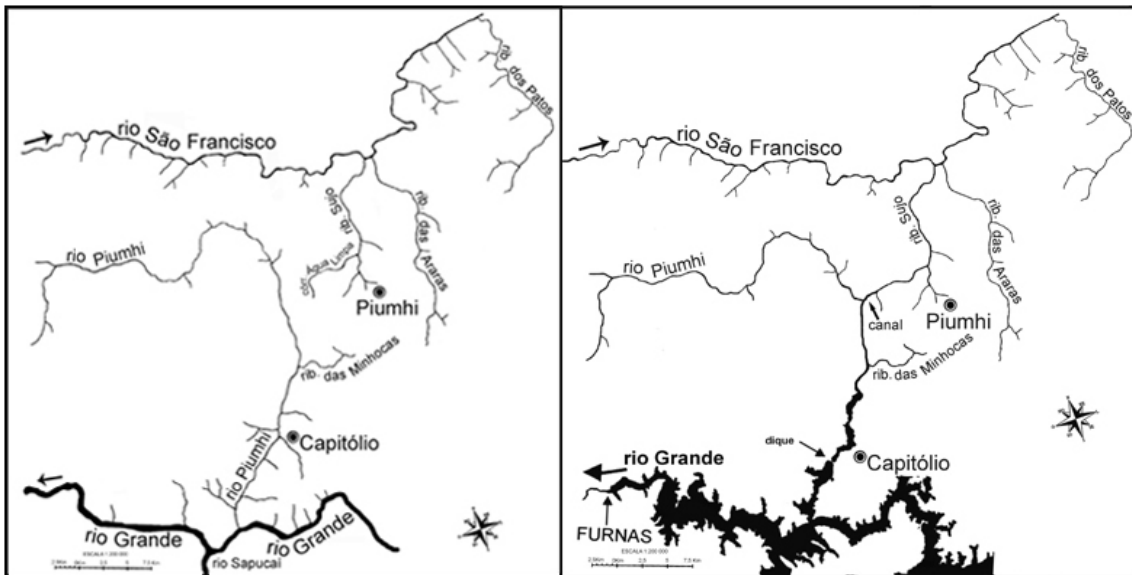


Figura 1 Mapas da região de transposição do rio Piumhi (a) antes e (b) depois da construção da Hidroelétrica de FURNAS. A seta indica o canal de transposição.

Como consequência dessa transposição que ocorreu a mais de 40 anos atrás, a ictiofauna do rio Piumhi e de seus afluentes, que representa parte das espécies de peixes da bacia do Alto rio Paraná foi jogada para a bacia do rio São Francisco, causando uma mistura de ictiofaunas que estavam separadas a milhões de anos (Moreira-Filho, 2006).

1.4. Ordem Siluriformes

A ictiofauna de água doce correspondente ao território brasileiro representa aproximadamente 55% das espécies na região Neotropical, compreendendo cerca de 2.500 espécies, distribuídas em 39 famílias e pertencentes a nove ordens, sendo muito mais diversa do que a fauna de peixes com representação marinha (Buckup *et al.*, 2007).

Siluriformes compreende o segundo maior grupo de peixes da região Neotropical, possuindo 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (Ferraris Jr., 2007), com distribuição maior em água doce na América do Sul e na África, havendo poucos grupos representados na Europa e na Ásia. Como exceção, a família Ictaluridae é predominante na América do Norte (Greenwood *et al.*, 1966) e as famílias Ariidae e

Plotosidae incluem representantes marinhos, além das famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae que apresentam espécies de estuário que às vezes penetram no mar (Pinna, 1998). Segundo Buckup *et al.* (2007), essa ordem representa cerca de 40% das espécies presentes no Brasil com mais de 1.000 espécies válidas, distribuídas em 11 famílias e mais de 200 gêneros.

Os Siluriformes são peixes de hábito predominantemente noturno, orientando-se principalmente por sentidos químicos, que ao contrário dos caracídeos, possuem hábitos mais sedentários (Britski, 1991). Quanto à morfologia, a principal característica é a ausência de escamas pelo corpo, o qual é totalmente recoberto por pele espessa ou placas ósseas. Normalmente possuem três pares de barbilhões, maxilares pequenos e sem dentes. Frequentemente o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral é transformado em acúleo forte e a nadadeira adiposa encontra-se normalmente presente (Moyle & Chech, 1988).

1.5. Família Auchenipteridae

Auchenipteridae, que é restrita a região Neotropical, compreende 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr., 2007) das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama & Sarmiento-Soares, 2007). Segundo Ferraris Jr. (2003), esse grupo é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae inclui somente os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende todos os outros gêneros, inclusive o grupo que é objetivo deste trabalho.

Morfologicamente, os auquenipterídeos são representados por bagres de pequeno a médio porte que possuem o corpo nu, a nadadeira adiposa é reduzida ou

ausente e o olho é coberto por tecido adiposo sem uma borda nítida. Internamente, apresentam uma grande quantidade de caracteres ósseos que servem de base para a formação desse grupo. Baseando-se em aspectos reprodutivos, essa família é a única entre os *catfishes* que apresenta inseminação interna e dimorfismo sexual, relacionado à nadadeira anal e, em algumas espécies relacionadas à nadadeira dorsal, barbilhões maxilares e outras partes do corpo. São tipicamente noturnos, porém algumas espécies de *Auchenipterus*, *Ageneiosus* e *Centromochlus* são encontradas se alimentando durante o dia. A maioria alimenta-se de insetos presentes na superfície da água, enquanto poucos representantes do grupo são primariamente planctívoros e piscívoros (Ferraris Jr., 2003). Apesar de serem predominantemente noturnas, algumas espécies são utilizadas na pesca artesanal e outras de menor porte são apreciadas por aquarífilistas (Graça & Pavanelli, 2007).

O gênero *Parauchenipterus* é caracterizado como um grupo monofilético irmão de *Trachelyopterus* baseado em um conjunto de nove caracteres sinapomórficos, dos quais um deles contradiz os resultados de Ferraris (1988) e Royero (1999), que afirmavam não haver dimorfismo sexual no grupo (Akama, 2004).

Em relação à *P. galeatus*, seu habitat corresponde a rios e lagoas, alimentando-se de larvas de insetos e pequenos peixes. Apesar de apresentar fecundação interna reproduzindo-se no período de outubro a março, não possui cuidado parental e a primeira maturação gonadal nas fêmeas e nos machos ocorre, respectivamente, com 108 mm e 113 mm (Graça & Pavanelli, 2007).

1.6. Estudos Citogenéticos em Auchenipteridae

Os estudos citogenéticos em Auchenipteridae são escassos e estão restritos apenas aos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Fenocchio & Bertollo, 1992; Ravedutti & Júlio Jr., 2001). Fenocchio & Bertollo (1992) analisando as espécies *Ageneiosus inermis* (citado como *A. brevifilis*) e *Ageneiosus atronases* provenientes do rio Amazonas, encontraram um número diplóide igual a 56 cromossomos com diferentes fórmulas cariotípicas. Essas duas espécies apresentaram RONS simples, porém diferencialmente localizadas, em posição terminal para *Ageneiosus inermis* e intersticial no braço longo de um par submetacêntrico para *A. atronases*.

Auchenipterus nuchalis e *Parauchenipterus galeatus* da região de Porto Rico, rio Paraná, e *Glanidium ribeiroi* do reservatório de Salto Caxias, rio Iguaçu, foram analisadas citogeneticamente e apresentaram $2n=58$ cromossomos com diferente número fundamental (Ravedutti & Júlio Jr., 2001). Os autores sugerem que essas diferenças na fórmula cariotípica são provenientes de mecanismos envolvendo rearranjos cromossômicos através de inversões pericêntricas, duplicações e deleções. A impregnação pela prata demonstrou que as três espécies apresentam RONS simples, sendo em posição intersticial para *A. nuchalis* e *Glanidium ribeiroi*, enquanto *P. galeatus* apresentou em posição terminal (Ravedutti & Júlio Jr., 2001).

1.7. DNA Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas que tem como função a fosforilação oxidativa, a qual é uma das vias bioquímicas mais importantes na produção de ATP. Acredita-se que

esta organela, assim como os cloroplastos, teve sua origem em uma possível relação simbiótica com células eucariontes primitivas (Boore, 1999). Esta organela possui um genoma próprio, composto por uma única molécula circular, sem íntrons e com o tamanho variando entre 15 e 17 Kb. O DNA mitocondrial básico de vertebrados é considerado conservado e possui 37 genes, dos quais 24 estão envolvidos com o mecanismo de transcrição do próprio DNA mitocondrial, sendo 22 tRNA, 2 rRNA (12S e 16S) e 13 que codificam polipeptídeos (3 citocromo oxidase c, 7 NADH desidrogenase, citocromo b e ATPase 6 e 8) (Garesse *et al.*, 1997; Ballard & Withlock, 2004). Ainda há uma região não codificante e altamente mutável (*D-loop*), que é a região responsável pelo controle da replicação e transcrição do DNA mitocondrial (Avise *et al.*, 1987; Park & Moran, 1994; Meyer, 1994) (Figura 2).

A região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) é normalmente dividida em três diferentes domínios (Domínios I, II, III). Os domínios I e II são considerados mais conservados quando comparados com o domínio III, que corresponde à região hipervariável do *D-loop* (Jondeng *et al.*, 2007). A taxa de mutação deste segmento do DNA mitocondrial chega a ser cem vezes mais rápida do que acontece no DNA nuclear. Esta é a principal seqüência do DNA mitocondrial utilizada para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações de uma única espécie, inclusive em peixes (Faber & Stepien, 1977; Meyer, 1994; Prioli *et al.*, 2002; Avise, 2004). Outras regiões mitocondriais são amplamente utilizadas, como os genes RNAr 12S, RNAr 16S, Citocromo b, ATPase 6 e 8, porém, estas regiões são bastante conservadas e não fornecem informações relevantes quanto às diferenças nas seqüências nucleotídicas de espécies muito próximas ou entre populações, não sendo, portanto, recomendada para estudos populacionais ou entre espécies muito próximas.

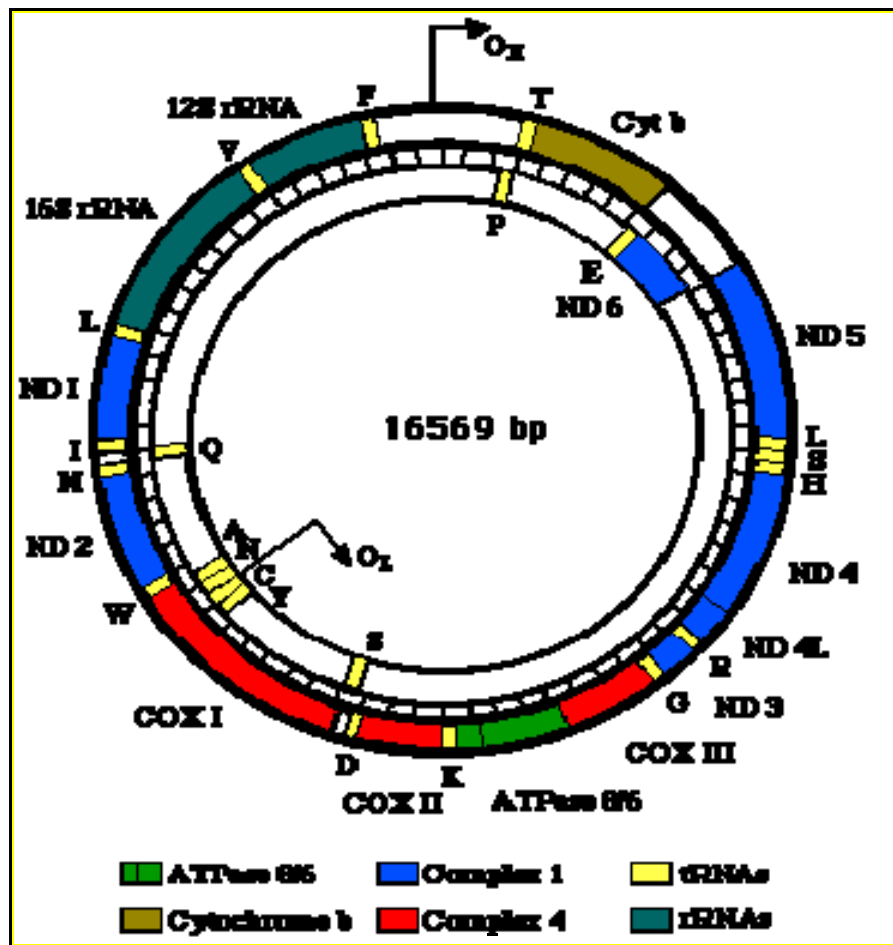


Figura 2 Esquema da molécula de DNA mitocondrial de vertebrados.

O interesse no estudo do DNA mitocondrial está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança predominantemente materna e não Mendeliana, sua presença em número haplóide nos organismos impede ou torna muito raro os eventos de recombinação, possui uma organização altamente compacta e alta taxa de evolução em relação ao DNA nuclear (Garesse *et al.*, 1997; Lewin, 2001). O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e inter-específicas, podendo ter aplicações em diversos tipos de estudos, entre eles, em estudos de biogeografia histórica, análises de zonas de hibridação, estimativas do grau de variabilidade genética, caracterização de estrutura populacional, relações filogenéticas e estudos de conservação genética. Entre os

Siluriformes, as análises de DNA mitocondrial têm se mostrado muito resolutivas na sistemática filogenética (Moyer *et al.*, 2004; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004; Hardman, 2005; Hardman & Lundberg, 2006; Koblmuller *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2006), bem como na resolução ou na identificação de grupos com conflitos taxonômicos (Martin & Bermingham, 2000; Perdices *et al.*, 2002; Vergara *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO PROJETO

Os estudos citogenéticos em populações naturais de peixes de água doce Neotropicais têm gerado importantes informações sobre modificações da estrutura cromossômica em algumas espécies, possivelmente favorecidas por isolamento geográfico em diferentes bacias hidrográficas e microbacias de uma região (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza *et al.*, 1995).

O DNA mitocondrial tem sido alvo para avaliação da variabilidade genética de populações de peixes (Prioli *et al.*, 2002). Em vertebrados, é uma molécula pequena e circular, compreendendo 16 a 18 mil pares de bases (pb). Possui uma região não codificadora conhecida como região controle, contendo o *displacement loop (D-loop)*, que é responsável pelo controle da replicação do mtDNA e transcrição do RNA (Awise *et al.*, 1987; Park & Moran, 1994). É a região mais variável do mtDNA, devido à alta taxa média de substituição nucleotídica e à variação no número de cópias de seqüências repetidas em *tandem* (Cesaroni *et al.*, 1997). Isto a torna adequada para a análise de variações intraespecíficas, ou seja, avaliar a variabilidade genética em populações naturais. Sua aplicação tem sido bastante ampla em populações de peixes (Prioli *et al.*, 2002).

Parauchenipterus galeatus possui uma distribuição ampla na América do Sul, podendo ser encontrado na bacia Amazônica, do Prata e do São Francisco (Akama & Sarmiento-Soares, 2007). Na bacia do Paraná, essa espécie era restrita a região abaixo de Sete Quedas (Guairá – PR) até 1982, quando ocorreu a construção hidrelétrica de Itaipu permitindo a ascensão desses indivíduos para o Alto Paraná (Graça & Pavanelli, 2007). Segundo Akama (2004), para o rio São Francisco, exemplares dessa espécie já foram coletados na região de Três Marias e Lagoa da Prata – MG, e entre São Francisco e

Paraná existe uma população de *P. galeatus* (citado como *Trachelyopterus galeatus*) localizada no rio Piumhi (Kantek *et al.*, 2007). O propósito desse trabalho foi analisar o cariótipo e a região controle do DNA mitocondrial de populações de *P. galeatus* do rio São Francisco, Piumhi e Paraná, e testar algumas hipóteses quanto à presença desta espécie na bacia do rio Piumhi. A primeira hipótese é que, com a inundação do reservatório de Furnas em 1963, e posterior transposição do Piumhi para a bacia do São Francisco, foi criada uma região de contato entre essas duas bacias, o que possibilitaria uma dispersão da população de Três Marias até o rio Piumhi, apesar dessa espécie não ser caracterizada como de hábito migratório. A segunda hipótese está associada ao fato desta espécie ter se estabelecido no Alto rio Paraná após a construção de Itaipu. Com isso, essa população, até então restrita a região abaixo de Sete Quedas, subiu o rio Paraná, apesar de seu hábito mais sedentário, podendo ter chegado até o dique de Capitólio (divisor entre a bacia do São Francisco e do Paraná), sendo posteriormente introduzida no rio Piumhi. A terceira hipótese seria que a população de *P. galeatus* do rio Piumhi já ocorresse nesta região, caracterizando uma população distinta.

O presente projeto teve por objetivo analisar esta problemática relacionada à biogeografia de *P. galeatus*, utilizando dados pela citogenética básica-molecular e análise de seqüências de DNA mitocondrial em distintas populações de *P. galeatus* dos rios Paraná, Piumhi e São Francisco. Para tanto, procurou-se:

- Caracterizar a estrutura cromossômica, o padrão das RONS e da heterocromatina de *P. galeatus* provenientes dessas três localidades;
- Localizar através da hibridização *in situ* as regiões de DNAr 18S e 5S;
- Analisar as seqüências *D-Loop* do DNA mitocondrial das três populações;
- Comparar os resultados obtidos das populações estudadas relacionando-os com a distribuição geográfica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pontos de Coleta Amostrados

Exemplares de *P. galeatus*, foram coletados em distintas bacias hidrográficas: bacia do rio São Francisco, município de Lagoa da Prata - MG, bacia do rio Piumhi, município de Capitólio - MG, bacia do rio Paraná, Reservatório de Jupiaá, município de Três Lagoas – MS (Fig. 1). A Figura 2 apresenta um exemplar de *P. galeatus*. A tabela a seguir apresenta dados referentes a cada um dos pontos de coleta, além do número de indivíduos analisados (Tab. 1).

Tabela 1 Pontos de coleta amostrados de *Parauchenipterus galeatus* do presente trabalho.

Localidade	Bacia Hidrográfica	Dados de GPS	Número amostral	Citogenética	DNA mitocondrial (<i>D-loop</i>)	Catálogo
Lagoa marginal, Lagoa da Prata – MG	São Francisco	19° 56' 15,1" S 45° 32' 13,8" O	4 ♂, 7 ♀	X	X	MZUSP 100985
Lagoa dos Tropeiros, Capitólio - MG	Piumhi	20° 33' 99,3" S 46° 03' 21,6" O	12 ♂, 9 ♀	X	X	NUP 8613
Reservatório de Jupiaá, Três Lagoas - MS	Alto Paraná	20° 44' 60,3" S 51° 39' 10,5" O	11 ♂, 7 ♀	X	X	NUP 8614

MZUSP: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo; NUP: Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura – Universidade Estadual de Maringá; MG: Estado de Minas Gerais.

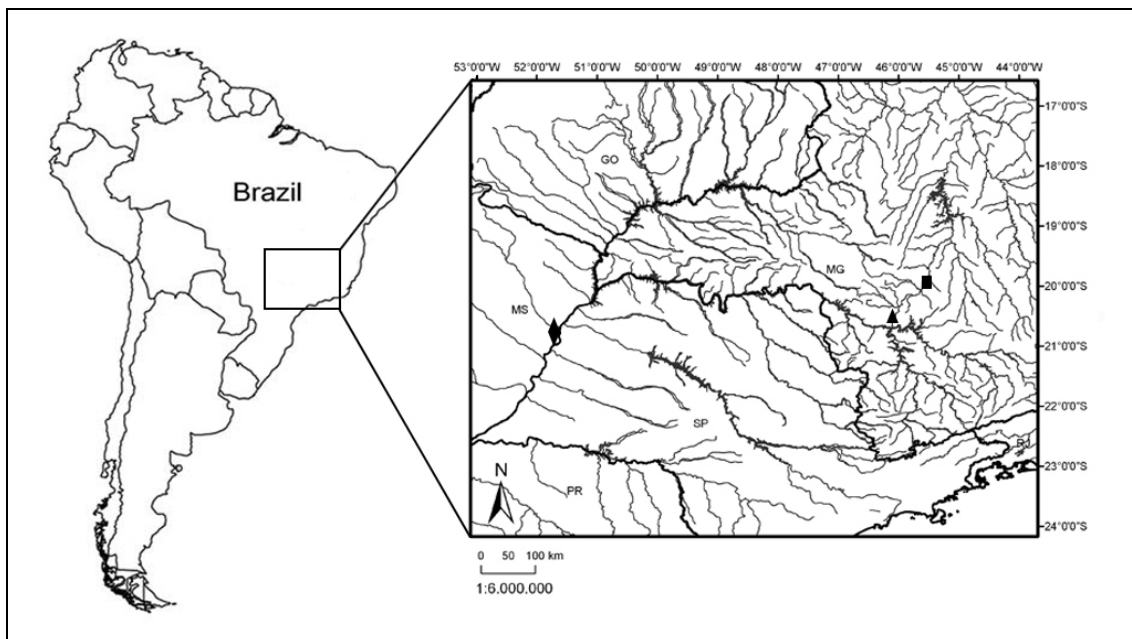


Figura 1 Mapa dos pontos de coleta amostrados, (Quadrado) bacia do rio São Francisco, Lagoa da Prata - MG, (Triângulo) bacia do rio Piumhi, Capitólio - MG, (Losango) bacia do rio Paraná, Três Lagoas - MS.



Figura 2 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus*. Comprimento total = 15,6 centímetros.

3.2. Tratamento *in vivo* (Bertollo *et al.*, 1978)

Foi injetada na região abdominal do animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso do animal. Posteriormente, o peixe foi mantido em aquário bem arejado durante 50 a 60 minutos. Decorrido esse tempo, o animal foi sacrificado e porções do rim foram retiradas. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), e transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10 ml desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de

pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, incubou-se esta suspensão a 37°C, durante vinte minutos. Em seguida, o material foi re-suspendido, com cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida transferida para um tubo de centrifuga. Algumas gotas de fixador, recém preparado (3 metanol: 1 ácido acético) foram acrescentadas ao material que foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm, descartando o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se, vagarosamente, 5-7 mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de fixador, misturando bem o material. Este foi guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, sendo posteriormente trabalhado conforme a descrição: pingar 2 a 3 gotas da suspensão obtida, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e aquecida ao redor de 50°C. Secar diretamente ao ar e corar com o corante Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 a 8 minutos. Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar.

3.3. Tratamento *in vitro* (Foresti *et al.*, 1993)

Fragmentos do rim foram colocados em 10 mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida será transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se 1 a 2 gotas de solução de colchicina 0,0125%, misturando-a bem

com o material. O material foi então transferido para estufa a 37°C, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi transferido novamente para estufa a 37°C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 10 gotas de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) misturado-as com o material repetidas vezes. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 10 mL de fixador, misturando o material repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação por 10 minutos e a fixação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Por fim, pingou-se o material sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 50°C. Após a secagem ao ar, seguiu-se a coloração do material com solução Giemsa 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 – 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

3.4. Indução do aumento do número de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988; Cavallini & Bertollo, 1988)

Para se obter uma boa análise cromossômica, fez-se necessário a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Uma vez que o órgão utilizado, o rim anterior possui função hematopoiética, ou seja, produzir células sanguíneas, tanto as de defesa como as de transporte de O₂/CO₂, foi utilizado aumento na frequência de mitoses nas células de defesa através de uma suspensão de levedura (0,5 g de fermento de padaria + 1,5 g de dextrose + 6 ml de H₂O). Essa solução foi injetada intraperitonealmente na proporção de 1 mL/100 gramas de peso animal

durante 24 horas, após o qual processou-se o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

3.5. Classificação dos cromossomos (Levan *et al.*, 1964)

Os homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica adotada foi a proposta por Levan *et al.* (1964), onde o limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00-1,70 , metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00 , subtelocêntrico (st);

RB= 7,01- acrocêntrico (a).

Para o cálculo do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos e os acrocêntricos com apenas um braço.

3.6. Bandamento C (Sumner, 1972 com modificações Lui *et al.*, 2009)

As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico

0,2N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60 °C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com o fluorocromo iodeto de propídeo na proporção de 20 µL de *anti-fading* / 0,7 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL).

3.7. Caracterização das Regiões Organizadoras de Núcleo (Howell & Black, 1980)

Sobre a lâmina com cromossomos adicionaram-se duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100 mL de água destilada e 0,5 ml de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata (50%). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em estufa a 60°C por um período de aproximadamente sete minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da mesma. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e as metáfases observadas em microscopia óptica.

3.8. Análise Sequencial

Foi realizada análise seqüencial das metáfases, na qual a mesma lâmina que continha metáfases que foram coradas com Giemsa (coloração convencional) e capturadas, foi submetida ao bandamento C e, posteriormente, ao tratamento com nitrato de Prata. Apesar de alguns cariótipos com diferentes marcadores não estarem apresentados com a mesma metáfase, a montagem com os três tratamentos propiciou maior precisão e determinação dos cromossomos marcadores.

3.9. Coloração pelo Fluorocromo CMA₃ e DAPI (Schmid, 1980)

Primeiramente foi colocado cerca de 150 µL da solução de Distamicina 0,3 mg/mL sobre o material, cobriu-se com lamínula e deixou agindo por 15 minutos. Escorre-se a lamínula e a lâmina foi lavada em água corrente, deixando secar por poucos minutos. Em seguida, foi adicionada 150 µL de solução de Cromomicina A₃ (1mg/mL) e coberta com lamínula, deixando agir por 60 minutos no escuro. A lamínula foi escorrida e a lâmina lavada em água corrente. Após secar ao ar, a lâmina foi montada com uma nova lamínula utilizando 100 µL de antifading + DAPI (0,2 mg/mL), como contra-corante. As lâminas foram mantidas no escuro e examinadas em microscopia de fluorescência após cerca de uma semana.

3.10. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foi obtida pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel *et al.* (1986). Para o trabalho do capítulo I foram utilizadas as sondas de rDNA 18S de *Prochilodus argenteus*, obtidas por Hatanaka & Galetti Jr. (2004), e de rDNA 5S de *Leporinus elongatus* por Martins & Galetti Jr. (1999).

Para o trabalho do capítulo II a obtenção das sondas de rDNA 18S e 5S foi realizada a partir do genoma de *Parauchenipterus galeatus* utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para amplificação do rDNA 5S foram utilizados os *primers*, construídos a partir da sequência do RNAr 5S de *Salmo*

gardnerii, descrita por Komiya & Takemura (1979) e a reação de PCR foi realizada de acordo com Pendás *et al.* (1994) contendo 2,5 uL PCR Buffer 10x, 0,75 uL MgCl₂ (50mM), 3,2 uL dNTPs (1,25 mM), 0,5 uL de cada *primer* (10 uM), 1 uL DNA (80 ng/mL), 0,1 uL Taq Polimerase (5 U/uL) e 16,45 uL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 2 ciclos de 95°C (1 min), 61°C (30 seg), 72°C (45 seg), 2 ciclos de 95°C (1 min), 59°C (30 seg), 72°C (45 seg), 2 ciclos de 95°C (1 min), 57°C (30 seg), 72°C (45 seg), 25 ciclos de 95°C (1 min), 61°C (30 seg), 72°C (45 seg), seguido por 72°C (7 min).

Para amplificação do rDNA 18S foram utilizados os *primers* 18SF/18SR conforme descrito por Cioffi *et al.* (2009) e a reação de PCR foi realizada contendo 2,5 uL PCR Buffer 10x, 0,75 uL MgCl₂ (50mM), 3,2 uL dNTPs (1,25 mM), 0,5 uL de cada *primer* (10 uM), 1 uL DNA (80 ng/mL), 0,1 uL Taq Polimerase (5 U/uL) e 16,45 uL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 35 ciclos de 95°C (1 min), 60°C (1 min), 72°C (45 seg), seguido por 72°C (7 min).

As sondas foram marcadas com biotina através de “Nick Translation” com o kit BionickTM Labeling System, seguindo-se as recomendações do fabricante (InvitrogenTM). As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100%) por 5 min cada e incubadas com RNase (40µg/mL em 2xSSC) em câmara úmida a 37°C por 1h. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min e as sondas foram desnaturadas em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10%, 2xSSC, DNA de placenta humana 200µg/µL, sonda 3,75 ng/µL, volume final de 400µL) a 100°C por 10 min. Posteriormente, foi colocados 50·µL da solução de hibridação em cada lâmina e incubado em câmara umedecida com formamida 60% overnight. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em solução de 2xSSC a 42°C por 20min e com 0,1xSSC a 60°C por 15 min. As

lâminas foram encubadas em tampão 5% NFDM (No Fat Dry Milk 5%, 4xSSC). Posteriormente, incubou-se as lâminas em 90µL de FITC 2,5ng/µL em NFDM por 30 min, lavou-se com solução de 2xSSC por 15 min e incubou-se novamente agora com 90µL de anti-avidina 1% em NFDM por 30 min. Quando necessário, após lavagem com solução salina 2xSSC, o passo anterior foi repetido a fim de se amplificar o sinal. Por fim, as lâminas foram montadas com 25 µL de *antifading* e 1µL iodeto de propídeo (50µg/mL) e analisadas em microscopia de fluorescência.

3.11. Análises Cariotípicas

As preparações de técnicas de citogenética clássica foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão.

As preparações de hibridação *in situ* e as colorações com fluorocromos foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. Com a utilização de uma câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50, as imagens selecionadas foram capturadas através do software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

3.12. Extração e Quantificação de DNA

O DNA total foi isolado de pedaço de tecido muscular preservado em etanol 100% e extraído com fenol através de método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a extração do DNA total foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A

estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras. Depois da quantificação, uma alíquota do DNA foi diluída a fim de se obter uma concentração final de 50 ng/μL para uso diário.

3.13. Amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial

Para amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial foram utilizados os primers FTTF (5' GCC TAA. GAG CAT CGG TCT TGTA 3' e F12R (5' GTC . AGG ACC ATG CCT TTG TG 3') (Sivasundar *et al.* 2001). Essa região foi amplificada através de uma reação de PCR contendo 5,0 uL de tampão de reação, 1,25 uL MgCl₂, 8,0 uL dNTP, 1,0 uL de cada primer, 2 uL DNA (50 ng/uL), 0,3 uL Taq Polimerase e 31,45 uL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 36 ciclos de 94°C (30 seg), 48°C (45 seg), 72°C (1 min e 30 seg), seguido por 72°C (7 min).

3.14. Sequenciamento e alinhamento das sequências *D-loop* do DNA mitocondrial

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Purification da Amersham-Pharmacia Biotech. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

O alinhamento das sequências da região *D-loop* do DNA mitocondrial foi realizado com a versão 4.0 do MEGA (Kumar *et al.*, 2001). O melhor método de análise encontrado pelo MODELTEST para a região *D-loop* foi o de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), com sítios invariantes (TrN+I). Desta forma, a árvore de distância neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) foi construída por este método. Nessa análise, os valores de suporte foram baseados em 1000 réplicas. O coeficiente gama foi estimado usando a versão 4.0 do PAUP (Swofford, 2002).

4. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS)

- Agostinho, CS, Júlio Jr., HF (1999) Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais (Ed. Lowe-McConnel). Edusp, 534p.
- Agostinho, CS, Júlio Jr., HF (2002) Observation of an invasions of piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the Upper Paraná River, Brasil. Acta Scientiarum 24, 391-395.
- Agostinho, AA, Gomes, LC, Suzuki, HI, Júlio Jr., HF (2004) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status (Eds. Carolsfeld, J, Harvey, B, Ross, C, Baer, A). IDRC publications, 380 p.
- Akama, A (2004) Sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 375 p.
- Akama, A, Sarmiento-Soares, LM (2007) Família Auchenipteridae. In: Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (Eds. Buckup, PA, Menezes, NA, Ghazzi, MS) Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Série Livros 23. Rio de Janeiro, 116-120.
- Avise, JC (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Segunda Edição. Sinauer. Associates Inc, 684 p.
- Avise, JC, Arnold, J, Ball, RM, Bermingham, E, Lamb, T, Neigel, JE, Reeb, CA, Saunders, NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18, 489-522.

- Ballard, JWO, Withlock, MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1, 103-120.
- Bonetto, AA (1986) The Paraná River System. In: The ecology of river systems (Eds. Davies, BR; Walker, KF). The Netherlands: Dr. Junk Publ, 541-556.
- Boore, JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucl. Acids Res* 27, 1767-1780.
- Britski, H (1991) Peixes de água doce. In: Atlas de fauna brasileira (Ed. Carvalho, JCM). Melhoramento. São Paulo, 84-93.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, 195 p.
- Cavallini, MM, Bertollo, LAC (1988) Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: II Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Maringá, PR, 32.
- Cesaroni D, Venanzetti F, Allegrucci G, Sbordoni V (1997) Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in natural populations of the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Biol. Evol.* 14, 560-568.
- Cioffi, MB, Martins, C, Centofante, L, Jacobina, U, Bertollo, LAC (2009) Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic Genome Research*, in press.
- Faber, JE, Stepien, CA (1977) The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and

- genera of the Percidae. In: Molecular Systematics of Fishes (Eds. Kocher, TD, Stepien, CA) Academic Press, New York, 129-143.
- Fenocchio, AS, Bertollo, LAC (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69, 41-46.
- Ferraris Jr., CJ (1988) The auchenipteridae: Putative monophyly and sistematics, with a classification of the neotropical Doradoid catfishes (Ostariophysi: Siluriformes). Tese de doutorado. City University of New York. New York, 229 p.
- Ferraris Jr., CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: Check List of Freshwater Fishes of South and Central America (Eds. Reis, RE, Kullander, SO, Ferraris Jr., CJ). EDIPUCRS. Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr., CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418, 1-628.
- Foresti, F, Oliveira, C, Almeida-Toledo, LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49, 810-813.
- Furnas (2007) Disponível em: <<http://www.furnas.com.br>>. Acesso em 07 de agosto.
- Garesse, R, Carrodegua, JA, Santiago, J, Perez, ML, Marco, R, Vallej, CG (1997) *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comp. Biochem. Physiol.* 117, 357-366.
- Graça, WJ, Pavanelli, CS (2007) Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, 241 p.
- Greenwood, PH, Rosen, DE, Weitzman, SH, Myers, GS (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 131, 339-456.

- Hatanaka, T, Galetti Jr., PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122, 239-244.
- Hardman, M (2005) The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 700-720.
- Hardman, M, Lundberg, JG (2006) Molecular phylogeny and chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes, Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 410-418.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36, 1014-1015.
- Ibama (2007a) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Bacia do Prata. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doprata.htm>. Acesso em 08 de agosto.
- Ibama (2007b) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Bacia do São Francisco. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_dosaofrancisco.htm>. Acesso em 07 de agosto.
- Jondeng, A, Sangthong, P, Zardoya, R (2007) The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong Giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene* 387, 49-57.

- Kantek, DLZ, Peres, WAM, Backup, PA, Moreira-Filho, O (2007) Caracterização citogenética de *Trachelyopterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae) do rio Piumhi. XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia. Itajaí, 53-54.
- Kobmuller, S, Sturmbauer, C, Verheyen, E, Meyer, A, Salzburger, W (2006) Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes, Synodontis). BMC Evol. Biol. 16, 49.
- Komiya, H, Takemura, S (1979) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. J. Biochem. 86, 1067–1080.
- Kumar, S, Tamura, K, Jakobsen, I, Nei, M (2001) MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, ver. 2.1 Pennsylvania State University, University Park, and Arizona State University, Tempe.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52, 201-220.
- Lewin, B (2001) Genes VII. Artmed Editora. 955 p.
- Lui, RL, Blanco, DR, Margarido, VP, Moreira-Filho, O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). Micron 40, 552-559.
- Martin, AP, Bermingham, E (2000) Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of neotropical catfish. Proc. R. Soc. Lond. 267, 1135-1141.
- Martins, C, Galetti Jr., PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chrom. Res. 7, 363-367.
- Meyer, A (1994) DNA technology and phylogeny of fish. In: Genetics and Evolution of Aquatic Organisms (Ed. Beaumont, AR) Chapman & Hall, London, 219-249.

- Moreira-Filho, O (2006) Uma transposição de rio esquecida. Revista Universidade Federal de Goiás. ISSN 1677-9037, 77-82.
- Moreira-Filho, O, Bertollo, LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Brazil. J. Genet. 14, 331-357.
- Moreira-Filho, O, Buckup, AP (2005) A poorly case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. Neotropical Ichthyol. 3, 449-452.
- Moyer, GR, Burr, BM, Krajewski, C (2004) Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. Zool. J. Linnean Society 140, 551-575.
- Moyle, PB, Chech, JJ (1988) Fishes - an introduction to ichthyology. Prentice Hall. Segunda edição, 559 p.
- Oliveira, C, Almeida-Toledo, LF, Foresti, F, Toledo-Filho, SA (1988) Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Caryologia 41, 227-236.
- Park, LK, Moran, P (1994) Developments in molecular genetic techniques in fisheries. Rev. Fish Biol. Fisheries 4, 272-299.
- Pendás, AM, Morán, P, Freije, JP, Garcia-Vazquez, E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic *Salmo* 5S rDNA. Cytogenetic and Cell Genetics 67, 31-36.
- Perdices, A, Bermingham, E, Montilla, A, Doadrio, I (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae) in Central America. Mol. Phylogenet. Evol. 25, 172-189.
- Pinkel, D, Straume, T, Gray, JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 2934-2938.

- Pinna, MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Phylogeny and classification of Neotropical Fishes (Eds. Malabarba, LR, Reis, RE, Vari, RP, Lucena, ZMS, Lucena, CAS). Edipucrs. Porto Alegre, 279-330.
- Prioli, SMAP, Prioli, AJ, Júlio, Jr., HF, Pavanelli, CS, Oliveira, AV, Carrer, H, Carraro, DM, Prioli, LM (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. Genet. Mol. Biol. 25, 421-430.
- Ravedutti, CG, Júlio Jr., HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. Cytologia 66, 65-70.
- Royero, RL (1999) Studies on the systematics and phylogeny of the catfish family Auchenipteridae (Teleostei: Siluriformes). Tese de Doutorado. University of Bristol, 377 p.
- Saitou, N, Nei, M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Segunda edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato, Y, Godinho, HP (1999) Peixes da Bacia do Rio São Francisco. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais (Eds. Lowe-McConnell, RH). Edusp, 534 p.
- Sato, Y, Godinho, HP (2004) Migratory fishes of the São Francisco river. In: Migratory fishes of South America: Biology (Eds. Carolsfeld, J, Harvey, B, Ross, C, Baer, A). Fisheries and Conservation Status. IDRC publications, 380 p.

- Shimabukuro-Dias, CK, Oliveira, C, Reis, RE, Foresti, F (2004) Molecular phylogeny of the armoured catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 152-163.
- Schmid, M (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 7, 83-103.
- Silva, PA, Vieira, GG, Farinasso, M, Carlos, RJ (2003) Determinação da extensão do rio São Francisco. *Anais da XI SBSR*. Belo Horizonte, 393-400.
- Sivasundar, A, Bermingham, E, Ortí, G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Biology* 10, 407-417.
- Souza, IL, Moreira-Filho, O, Bertollo, LAC (1995) Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. *Cytobios* 83, 273-281.
- Sullivan, JP, Lundberg, JG, Hardman, M (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei, Siluriformes) using rag 1 and rag 2 nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 636-662.
- Sumner, AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304-306.
- Swofford, DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other methods), ver. 4. Software, Sinauer Associates, Sunderland.
- Tamura, K, Nei, M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.

Vergara, J, Azpelicueta, MM, Garcia, G (2008) Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotrop. Ichthyol.* 6, 75-85.

Capítulo I

**Primeira descrição de cromossomos B na família Auchenipteridae,
Parauchenipterus galeatus (Siluriformes) da bacia do rio São Francisco (MG)**

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco river basin (MG, Brazil). Micron 40 (5-6): 552-559 (ANEXO I).

Resumo

Os cromossomos B são considerados adicionais e dispensáveis, e devem ter sua origem a partir dos cromossomos A seguindo uma evolução própria. Em peixes, aproximadamente metade das espécies neotropicais que possuem cromossomos B são Characiformes e 35% são Siluriformes, sendo que nenhum relato para Auchenipteridae havia ocorrido até o momento. Os cromossomos B encontrados nesta população de *Parauchenipterus galeatus* da bacia do rio São Francisco do estado de Minas Gerais (Brasil) são pequenos, metacêntricos, totalmente heterocromáticos e possuem variação numérica intra e interindividual. O número diplóide encontrado foi igual a 58 cromossomos (22 metacêntricos, 16 submetacêntricos, 12 subtelocêntricos e 8 acrocêntricos). As NORs são simples e a heterocromatina intercalar aos sítios ribossomais, caracterizada pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI, é de constituição GC-rica. O rDNA 5S está localizado intercaladamente em apenas um par cromossômico. Uma hipótese sobre a origem dos cromossomos B em *P. galeatus* e uma revisão sobre cromossomos B em catfishes também é apresentada no presente trabalho.

Palavras-chave: Citogenética, CMA₃, DAPI, rDNA 18S, rDNA 5S.

Introdução

Siluriformes compreende o segundo maior grupo de peixes da região Neotropical, possuindo 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (Ferraris Jr., 2007), com distribuição mais ampla em água doce na América do Sul e na África, havendo poucos grupos representados na Europa e na Ásia. Como exceção, a família Ictaluridae é predominante na América do Norte (Greenwood *et al.*, 1966) e as famílias

Ariidae e Plotosidae incluem representantes marinhos, além das famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae que apresentam espécies de estuário que às vezes penetram no mar (Pinna, 1998). Segundo Buckup *et al.* (2007), Siluriformes representa cerca de 40% das espécies presentes nas bacias hidrográficas brasileiras com mais de 1.000 espécies válidas, distribuídas em 11 famílias e mais de 200 gêneros.

Auchenipteridae, que é restrita a região Neotropical, compreende 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr., 2007), das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares, 2007). Esse grupo é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae (Pinna, 1998; Ferraris Jr., 2003). Centromochlinae inclui os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende os demais dezesseis gêneros válidos para a subfamília.

Os estudos citogenéticos em Auchenipteridae são escassos e estão restritos aos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Fenocchio e Bertollo, 1992; Ravedutti e Júlio Jr., 2001). *Ageneiosus inermis* (citado como *Ageneiosus brevifilis*) e *Ageneiosus atronatus* da bacia do rio Amazonas apresentaram $2n = 56$ cromossomos (Fenocchio e Bertollo, 1992), enquanto *Auchenipterus osteomystax* (citado como *Auchenipterus nuchalis*), *Glanidium ribeiroi* e *Parauchenipteris galeatus* apresentaram $2n = 58$ cromossomos (Ravedutti e Júlio Jr., 2001). Com base nestes estudos, até o momento não havia nenhuma descrição sobre a existência de cromossomos B em Auchenipteridae.

Segundo Camacho (1993), os cromossomos B são considerados adicionais e dispensáveis, presentes em alguns indivíduos de algumas populações, que devem se originar a partir dos cromossomos A, mas seguem sua própria evolução. Dessa forma, os cromossomos B não constituem elementos essenciais ao crescimento,

desenvolvimento e reprodução dos organismos. Os cromossomos B são totalmente, ou na sua maior parte, compostos por heterocromatina, e uma das características da heterocromatina é sua replicação tardia (Volobujev, 1981). Segundo Jones e Rees (1982), o termo cromossomo B deve ser empregado somente para os casos em que os supranumerários apresentam certa freqüência na população e representa uma característica da mesma, dessa forma, sendo um polimorfismo em vez de uma variação.

Os modelos de origem intra e interespecíficos são amplamente aceitos e bem documentados na literatura através de estudos citogenéticos e moleculares (Camacho *et al.*, 2000). O grande cromossomo B metacêntrico de *Astyanax scabripinnis* é um exemplo de origem intra-específica em peixes, tratando-se de um caso de isocromossomo (Vicente *et al.*, 1996; Mestriner *et al.*, 2000). *Poecilia formosa*, que apresenta cromossomo B, é considerado um híbrido interespecífico entre *P. mexicana* e *P. latipinna* (Dawley, 1989); fato semelhante pode ser encontrado para a origem do microcromossomo de *Cichla* sp. (híbrido entre *Cichla reticulata* e *Cichla monoculus*), porém segundo os autores, uma hipótese intraespecífica de quebra de fragmento cromossômico relacionada a fatores ambientais não pode ser descartada (Feldberg *et al.*, 2004).

Aproximadamente metade das espécies de peixes neotropicais que possuem cromossomos B são Characiformes e 35% são Siluriformes. Apenas cinco famílias de Siluriformes (Callichthyidae, Heptapteridae, Pimelodidae, Trichomycteridae, Loricariidae) apresentam relatos desses cromossomos (Carvalho *et al.*, 2008). No presente trabalho é apresentada uma revisão de cromossomos supranumerários em catfishes (Tab. 1) e a primeira descrição em um representante da família Auchenipteridae.

Tabela 1 Revisão de cromossomos B em *catfishes*.

Família/Espécie	Localidade	HB	2n	FA	FI	NB	Tamanho do B	MB	Referências
Callichthyidae									
<i>Callichthys callichthys</i>	Arroio Branquinha, rio Gravataí	-	58	23	15	0 - 4	-	-	1
<i>Callichthys callichthys</i>	Rio Guaíba	-	57	3	2	0 - 3	Pequeno	m, sm	1
<i>Callichthys callichthys</i>	Lagoa dos Patos	-	58	1	1	0 - 16	Pequeno	m, sm	1
<i>Callichthys callichthys</i>	Itanhaém, Brasil	-	58	3	1	0 - 5	Micro	-	2
<i>Callichthys callichthys</i>	Lagoas na cidade de Reconquista, Argentina	LP	56	10	5	0 - 2	Pequeno	m	3
<i>Callichthys callichthys</i>	Rio Iguaçu, Brasil	LP	58	6	-	0 - 2	-	-	4
<i>Callichthys callichthys</i>	Córrego do Pombo, Marília, Brasil	UP	56	2	2	0 - 8	Micro	-	5
<i>Callichthys callichthys</i>	Corumbá, Brasil	P	56	3	1	0 - 1	Grande	m	5
<i>Corydoras aeneus</i>	Rio Corumbataí, Tietê, Brasil	UP	60	10	-	0 - 2	-	a	6
<i>Corydoras aeneus</i>		-	60	33	9	0 - 3	Pequeno	sm, st	7
<i>Corydoras aeneus</i>	Tietê river, Bauru, Brazil	UP	60	-	-	2	-	-	8
Heptapteridae									
<i>Pimelodella kronei</i>	Iporanga, Brazil	-	58	9	1	1	Micro	-	9
<i>Rhamdia branneri</i>	Reservatório Segredo, Guarapuava, Brasil	UP	58	13	12	0 - 4	Médio	m, sm	10

Referências: 1 - Erdtmann *et al.* (1990); 2 - Oliveira *et al.* (1993); 3 - Sanchez e Fenocchio (1996); 4 - Maurutto *et al.* (2006); 5 - Shimabukuro-Dias *et al.* (2005); 6 - Pacheco *et al.* (2008); 7 - Oliveira *et al.* (1988); 8 - Prado *et al.* (2006); 9 - Almeida-Toledo *et al.* (1992); 10 - Abucarma e Martins-Santos (2001)

Para as abreviações veja legenda no final da tabela.

Tabela 1 Continuação

Família/Espécie	Localidade	HB	2n	FA	FI	NB	Tamanho do B	MB	Referências
<i>Rhamdia branneri</i>	Rio Iguaçu, Quedas do Iguaçu, Brasil	LP	58	-	-	0 - 4	Médio	-	11
<i>Rhamdia cf. hilarii</i>	Córregos Hortelã, Quinta and Jacutinga, rios Araquá e Pardo, reservatório Jurumirim, Brasil	UP	58	17	3	0 - 3	Médio	m	12
<i>Rhamdia hilarii</i>	Reservatório Monjolinho, São Carlos, Brasil	UP	58	51	50	0 - 5	Pequeno/Médio	m	13
<i>Rhamdia hilarii</i>	Lagoas Nova e Jataí, Luis Antonio, Brasil	UP	58	1	1	0 - 2	Pequeno	-	14
<i>Rhamdia hilarii</i>	Reservatório Lobo, Itirapina, Brasil	UP	58	29	-	0 - 3	Médio	m	15
<i>Rhamdia hilarii</i>	Reservatório 29, Luis Antonio, Brasil	UP	58	33	-	0 - 5	Médio	m	15
<i>Rhamdia hilarii</i>	Rio São Francisco, Três Marias, Brasil	SF	58	1	1	2	Médio	m	15
<i>Rhamdia hilarii</i>	Rio Mogi-Guaçu, Brasil	UP	58	11	-	0 - 2	Médio	m	16
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Guaíba, Lagoa dos Quadros, Brasil	-	58	30	13	0 - 2	Médio	m	17
<i>Rhamdia quelen</i>	Lagoas Nova e Jataí, rio Mogi-Guaçu, Brasil	UP	58	1	1	0 - 4	Pequeno	-	14
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Mogi-Guaçu, Luis Antonio, Brasil	UP	58	1	1	4	Médio	m	15
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Iguaçu, Porto União, Brasil	LP	58	3	-	0 - 1	Médio	m	15
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Aguapeí, Brasil	UP	58	20	10	0 - 4	Médio/Grande	m	18

Referências: 11 - Roman *et al.* (2002); 12 - Vissoto *et al.* (1999); 13 - Fenocchio e Bertollo (1990); 14 - Fenocchio (1993); 15 - Fenocchio *et al.* (2000); 16 - Maistro *et al.* (2002); 17 - Hochberg e Erdtmann (1988); 18 - Stivari e Martins-Santos (2002)

Para as abreviações veja legenda no final da tabela.

Tabela 1 Continuação

Família/Espécie	Localidade	HB	2n	FA	FI	NB	Tamanho do B	MB	Referências
<i>Rhamdia quelen</i>	Arroio Sarandi, Lagoa Fragata, Canal São Gonçalo canal, Arroio Santa Izabel, Brasil	-	58	14	6	0 - 3	-	-	19
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Iguaçu, Brasil	LP	58	10	1	0 - 1	Pequeno	m	20
<i>Rhamdia quelen</i>	Córrego Fazzari, UFSCar, Brasil	UP	58	-	-	0 - 2	Pequeno	-	21
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Peixe, Videira, Brasil	-	58	40	-	0 - 1	-	-	22
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Taquarussu, Brasil	UP	58	19	8	0 - 4	Médio/Grande	m	23
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Uberabinha, Uberlândia, Brasil	UP	58	17	-	0 - 7	Pequeno/Médio	m, sm, a	24
<i>Rhamdia quelen</i>	Córrego Sangão e rio São José, Cascavel, Brasil	UP	58	-	-	1	-	-	25
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio São Francisco, Três Marias, Brasil	SF	58	9	-	0 - 4	Pequeno/Micro	m	26
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Araras, Brasil	UP	58	-	-	6	-	-	25
<i>Rhamdia quelen</i>	Córrego Bebedouro, Uberlândia, Brasil	UP	58	-	-	0 - 2	-	-	27
<i>Rhamdia quelen</i>	Córrego Tatupeba, Maringá, Brasil	UP	58	7	5	0 - 1	Pequeno	a	28
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Água dos Patos, Iepê, Brasil	UP	58	9	9	0 - 2	Médio	m	29

Referências: 19 - Born (2002); 20 - Fenocchio *et al.* (2003); 21 - Garcia *et al.* (2003b); 22 - Grahl e Victoriano (2004); 23 - Stivari e Martins-Santos (2004); 24 - Guilherme (2005); 25 - Garcia *et al.* (2006); 26 - Garcia (2005); 27 - Silva e Morelli (2006); 28 - Carvalho *et al.* (2007); 29 - Moraes (2007)

Para as abreviações veja legenda no final da tabela.

Tabela 1 Continuação

Família/Espécie	Localidade	HB	2n	FA	FI	NB	Tamanho do B	MB	Referências
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Água das Pedras, Londrina, Brasil	UP	58	5	5	0 - 2	Médio	m	29
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Taquari, bacia do Tibagi, Jataizinho, Brasil	UP	58	7	6	0 - 2	Médio	m	29
<i>Rhamdia quelen</i>	Piscicultura FUNPIVI, Timbó, Brasil	-	58	4	2	0 - 2	Médio	m	29
<i>Rhamdia quelen</i>	Planalto da Bodoquena, Porto Murтинho, Brasil	P	58	4	4	0 - 3	Médio	m, sm	30
<i>Rhamdia quelen</i>	Rio Piquiri, Nova Laranjeiras, Brasil	UP	58	6	-	0 - 3	Micro	-	31
<i>Rhamdia sapo</i>	Buenos Aires, Argentina	-	58	12	3	0 - 1	Médio/Pequeno	m, a	32
<i>Rhamdia</i> sp.	Reservatório Furnas, rio Sapucaí, Alfenas, Brasil	UP	58	20	-	0 - 3	-	-	33
<i>Rhamdia</i> sp.	Reservatório Segredo, Guarapuava, Brasil	UP	58	4	2	0 - 2	Pequeno	a	10
<i>Rhamdia</i> sp.	Córrego Grande, Pindamonhangaba, Brasil	UP	58	13	10	0 - 4	Pequeno	m	42
<i>Rhamdia voulezi</i>	Reservatório Segredo, Guarapuava, Brasil	UP	58	4	3	0 - 2	Médio	m	10
Pimelodidae									
<i>Bergiaria westermanni</i>	Rio São Francisco, Brasil	SF	56	7	7	0 - 5	Pequeno	-	34
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Rio Tibagi, Londrina, Brasil	UP	56	11	9	0 - 3	Micro	-	35

Referências: 10 - Abucarma e Martins-Santos (2001); 29 - Moraes (2007); 30 - Moraes *et al.* (2007); 31 - Silva e Margarido (2007); 32 - Valcarcel *et al.* (1993); 33 - Andrade *et al.* (1998); 34 - Dias e Foresti (1993); 35 - Carvalho *et al.* (2004); 42 - Garcia *et al.* (2003a)

Para as abreviações veja legenda no final da tabela.

Tabela 1 Continuação

Família/Espécie	Localidade	HB	2n	FA	FI	NB	Tamanho do B	MB	Referências
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Reservatório Capivara, Sertanópolis e Porecatu, Brasil	UP	56	25	18	0 - 1	Micro	-	36
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Rio Mogi-Guaçu, Brasil	UP	56	4	4	0 - 2	Micro	-	37
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Reservatório Jurumirim, Brasil	UP	56	8	3	0 - 2	Pequeno	a	12
<i>Megalonema platanum</i>	Rio Tibagi, Londrina, Brasil	UP	54	-	1	0 - 1	Micro	a	38
<i>Pimelodus ortomanni</i>	Reservatório Caxias, bacia do Iguaçu, Brasil	UP	56	4	4	0 - 4	Pequeno	m, a	39
<i>Pimelodus</i> sp.	Reservatório Caxias, bacia do Iguaçu, Brasil	UP	56	41	6	0 - 4	Pequeno	m, a	39
Trichomycteridae									
<i>Trichomycterus</i> sp. B	Rio Iguaçu, Brasil	UP	54	-	1	0 - 2	Pequeno/ Pequeno	m, a	40
Auchenipteridae									
<i>Parauchenipterus galeatus</i>	Lagoa marginal bacia do rio São Francisco, Brasil	SF	58	10	7	0 - 2	Pequeno	m	41

Referências: 12 - Vissoto *et al.* (1999); 36 - Carvalho e Dias (2005); 37 - Dias e Foresti (1990); 38 - Carvalho *et al.* (2006); 39 - Borin e Martins-Santos (2004); 40 - Borin e Martins-Santos (1997); 41 - Presente trabalho.

HB = Bacia Hidrográfica; 2n = número diplóide; FA = indivíduos analisados; FI = indivíduos com cromossomo B; NB = número de cromossomos B; MB = morfologia do cromossomo B; UP = Alto Paraná; LP = Baixo Paraná; P = Paraguai; SF = São Francisco; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.

Materiais e Métodos

Foram analisados através de técnicas citogenéticas básicas e moleculares 10 exemplares de *Parauchenipterus galeatus* (7 fêmeas e 3 machos) coletados em uma lagoa marginal localizada na margem direita do rio São Francisco no município de Lagoa da Prata, estado de Minas Gerais, Brasil. Esses exemplares foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 100985).

A preparação da suspensão celular de cromossomos mitóticos foi obtida a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993). Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo de acordo com Henyey *et al.* (2002). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan *et al.* (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço.

O padrão de distribuição de heterocromatina foi determinado através do método descrito por Sumner (1972), em lâminas previamente analisadas com coloração convencional Giemsa, as quais foram descoradas em fixador (3 metanol : 1 ácido acético) e submetidas ao bandamento C (análise seqüencial). Uma modificação na técnica de Sumner (1972) foi introduzida, em que a coloração por Giemsa foi substituída pelo fluorocromo iodeto de propídeo na proporção de 20 μ L de *anti-fading* com 0,7 μ L iodeto de propídeo (50 μ g/mL). A utilização do fluorocromo iodeto de propídeo possibilitou maior nitidez das regiões heterocromáticas. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX50 e as imagens foram capturadas, convertidas para escala de cinza e invertidas (Fig. 1) no software *Image-Pro Plus* versão

6.3 (Media Cybernetics). As regiões organizadoras de nucléolos ativas foram identificadas utilizando impregnação pelo nitrato de Prata (Howell e Black, 1980), e esta preparação também foi efetuada em metáfases anteriormente coradas por Giemsa (análise seqüencial). A coloração com os fluorocromos base específicos Cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI foi realizada segundo Schmid (1980).

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foi realizada utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente - FISH (Pinkel *et al.*, 1986), com sondas obtidas das espécies de peixes *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999), respectivamente. As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* segundo as instruções do fabricante (*Bionick Labeling System* - Invitrogen). Os cromossomos foram contra-corados com solução de *anti-fading*/iodeto de propídeo (50 µg/mL) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software *Image-Pro Plus* versão 6.3 (Media Cybernetics).

Resultados

O número diplóide encontrado para a espécie estudada foi de 58 cromossomos para ambos os sexos, apresentando 22 metacêntricos, 16 submetacêntricos, 12 subtelo-cêntricos e 8 acrocêntricos e NF = 108 (Fig. 2). Dos dez exemplares analisados, sete (dois machos e cinco fêmeas) apresentaram cromossomos B de tamanho pequeno e do tipo metacêntrico. Seis exemplares apresentaram até 2 B e um macho apresentou até 1 B (Tab. 2). Entre os exemplares com B, 38,2% das células analisadas apresentaram apenas 1 B, 27,2% apresentaram 2 B e 34,6% não apresentaram B. Houve variação intra-individual de cromossomos B.

Tabela 2 Frequência de cromossomos B em *Parauchenipterus galeatus* da bacia do São Francisco.

Exemplar	Sexo	Número de cromossomos B/célula			Células analisadas	Células com B (%)
		0 B	1 B	2 B		
18524	♀	12	10	13	35	65,7
18525	♀	33	-	-	33	0
18526	♀	08	05	05	18	55,5
18536	♂	24	26	14	64	62,5
18537	♀	02	03	01	06	66,6
18538	♀	09	10	02	21	57,4
18545	♂	04	05	-	09	55,5
18546	♀	07	14	17	38	81,5
18547	♂	11	-	-	11	0
18548	♀	28	-	-	28	0
Total		138	73	52	263	

O bandamento C demonstrou que a heterocromatina está dispersa em posição terminal de quase todos os cromossomos do complemento A, com marcação bitelomérica em alguns cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelo-cêntricos. Também foram evidenciadas marcações pericentroméricas em alguns cromossomos acrocêntricos. Os cromossomos B mostraram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 3).

A impregnação com o nitrato de prata evidenciou RONS simples em posição terminal no braço curto do par subtelo-cêntrico 23 (Fig. 2). Esta mesma região respondeu positivamente ao fluorocromo Cromomicina A₃, sendo confirmado negativamente pelo DAPI (Fig. 4) e sugerindo que a heterocromatina intercalar ao sítio de rDNA 45S possui constituição GC - rica.

A hibridização com sonda de rDNA 18S também evidenciou um único par cromossômico portador destes sítios, correspondente ao evidenciado pelo nitrato de prata. A sonda de rDNA 5S mostrou que o sítio está localizado em posição proximal ao centrômero no braço curto do par de cromossomos submetacêntricos 16 (Fig. 4).

Discussão

Diferentes técnicas citogenéticas têm sido utilizadas para desvendar a origem dos cromossomos B, como através de análises por bandamento C (Vicente *et al.*, 1996), complexo sinaptonêmico (Dias *et al.*, 1998) e hibridização com sonda DNA satélite (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006), entre outros. Salvador e Moreira-Filho (1992) e Carvalho *et al.*, (2008) mostraram que a maioria dos cromossomos supranumerários em peixes neotropicais são metacêntricos, fato que reforça o modelo de origem por isocromossomo. Segundo Néo *et al.* (2000a), o surgimento dos diferentes tipos de cromossomos B em *Astyanax* (submetacêntricos, subteloicêntricos e acrocêntricos) representaria formas derivadas dos metacêntricos originados por isocromossomo. Essas formas derivadas teriam sua origem devido ao comportamento na meiose pareando os braços do cromossomo B, facilitando rearranjos, tais como, inversões pericêntricas, duplicações e deleções, que causariam mudança no tamanho e na forma. No presente trabalho, os cromossomos B apresentados nos exemplares da população de *P. galeatus* da bacia do rio São Francisco são pequenos e do tipo metacêntrico, com formas variantes desses cromossomos B não detectadas.

Os cromossomos B aqui observados estão presentes no número máximo de dois por célula. Segundo Camacho *et al.*, (2000), o número máximo de cromossomos B em uma população é o resultado das interações entre o sistema de acúmulo (aumento da frequência) e os efeitos prejudiciais que esses cromossomos podem gerar aos portadores. Em quase 40% dos casos em peixes neotropicais foi encontrado apenas 1 cromossomo B por indivíduo. Entretanto, Erdtmann *et al.* (1990) mostram que em *Callichthys callichthys* este número pode chegar até 16. Cerca de 80% das cinquenta e oito populações de catfishes que apresentam descrições de cromossomos B até o

momento e que foram revisadas neste trabalho possuem mais do que 1 supranumerário por indivíduo, e em aproximadamente metade das descrições os supranumerários são encontrados em mais de um indivíduo na população (Tab. 1). Jones e Rees (1982) sugerem que o termo cromossomo B seja empregado somente para os casos em que esses supranumerários são encontrados com certa frequência na população, mas é possível verificar que em alguns casos esses cromossomos apresentam-se de forma esporádica na população, sendo encontrados em apenas um indivíduo, e em outros casos, a frequência não é relatada.

Estudos populacionais em espécies que apresentam cromossomos B mostram alguns aspectos importantes. Em *Myrmeleotetrix maculatus*, populações amplamente distribuídas desse gafanhoto apresentam variação no número de cromossomos B nas diferentes localidades estudadas, sendo possivelmente relacionadas a diferenças nas condições ambientais dessas regiões. Essa variação na quantidade de cromossomos B não deve estar relacionada a um único elemento, portanto, o conjunto de diversos fatores ambientais deve ser considerado para tal situação (Jones e Rees, 1982). Em peixes, Néo *et al.* (2000b) verificaram um gradiente crescente na frequência de cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* das regiões de menor altitude para as de maior altitude em populações da serra da Mantiqueira.

P. galeatus, analisados no presente estudo, foram coletados em uma lagoa marginal em que as condições ambientais podem ser consideradas ideais para a manutenção de cromossomos B quando comparadas a outros locais em que a espécie pode ser encontrada, pois o isolamento geográfico parcial da lagoa pode proporcionar uma redução no fluxo gênico com as outras populações da bacia do São Francisco. Este fato poderia justificar a frequência de 70% de exemplares portadores desses cromossomos B na população. Fato semelhante tem sido descrito em diferentes

populações de *Astyanax scabripinnis* isoladas em cabeceiras de riachos (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Vicente *et al.*, 1996; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Mestriner *et al.*, 2000; Néo *et al.*, 2000a; Néo *et al.*, 2000b; Maistro *et al.*, 2001). Nos estudos anteriormente citados, os autores também verificaram que exemplares portadores do macro cromossomo B em *A. scabripinnis* apresentam uma constância de 100% nas células analisadas. Casos semelhantes já foram relatados em outras espécies de Characiformes. Entretanto, as espécies de Siluriformes com descrição de cromossomos B apresentam variação intra-individual. Em catfishes, a maioria dos cromossomos B são pequenos e/ou médios (Tab. 1). Os micro-cromossomos são de difícil determinação morfológica. Verifica-se que nos casos em que a morfologia foi relatada, aproximadamente 65% correspondem a metacêntricos (Tab. 1). Estes dados reforçam a proposta de origem isocromossômica dos cromossomos B, que também pode ser sugerida para espécie estudada no presente trabalho.

Das dezoito espécies de catfishes com cromossomos B, sete são da família Heptapteridae. Esta família possui trinta e sete distintas populações com descrição desses cromossomos, sendo uma no gênero *Pimelodella* e trinta e seis em *Rhamdia*. A presença de cromossomos B tem sido frequentemente descrita no gênero *Rhamdia* (Fenocchio *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2003a; Stivari e Martins-Santos, 2004; Carvalho *et al.*, 2008, entre outros). O máximo de B encontrado para o gênero é em uma população de *Rhamdia quelen* do rio Uberabinha, com até sete cromossomos (Guilherme, 2005) e, na maioria dos casos são de tamanho pequeno ou médio (Tab. 1). Segundo Fenocchio *et al.* (2000) e Moraes *et al.* (2007), os cromossomos B nesse gênero podem ter uma origem comum, devido à ampla distribuição geográfica e sua alta incidência neste gênero.

Os cromossomos B são comumente encontrados em Heptapteridae, diferentemente das outras famílias de *catfish* que possuem menos descrições. Pimelodidae é o segundo grupo mais representativo com cinco espécies, enquanto Callichthyidae apresenta somente duas. Apenas uma espécie em cada uma das famílias Trichomycteridae e Auchenipteridae apresenta cromossomos B, sendo esta última a do presente trabalho.

O número diplóide encontrado em *P. galeatus* da bacia do rio São Francisco é o mesmo já descrito para uma população desta mesma espécie da região de Porto Rico no rio Paraná (Ravedutti e Júlio Jr., 2001). Diferenças na fórmula cariotípica e no NF entre as duas populações podem ser observadas, principalmente devido à maior quantidade de cromossomos acrocêntricos presentes na população do Alto Paraná. Em *Pimelodus maculatus* com $2n = 56$ cromossomos foi possível verificar um caso semelhante em que diferentes populações possuem mesmo número diplóide com variação na fórmula cariotípica e no NF, sendo proposto que rearranjos do tipo inversão e/ou translocação explicariam essa diversidade (Mazzuchelli *et al.*, 2007; Treco *et al.*, 2008). Os dados do presente trabalho, comparados com os da outra população de *P. galeatus* analisada do alto Paraná, indicam que esses rearranjos cromossômicos também podem ser os responsáveis por essas diferenças cariotípicas.

Segundo Ravedutti e Júlio Jr., (2001), RONS simples em posição intersticial pode ser considerada uma característica de Auchenipteridae. Em *Parauchenipterus galeatus* deste estudo, as RONS apresentaram-se simples em posição terminal no par cromossômico 23, igual à outra população do rio Paraná. Porém, nos exemplares do rio Paraná o cromossomo portador das RONS é um acrocêntrico, enquanto na população do rio São Francisco é um subtelocêntrico. Inversão pericêntrica pode ser o rearranjo responsável por tal divergência.

As regiões heterocromáticas evidenciadas pelo bandamento C apresentaram-se parcialmente semelhantes às encontradas em *Auchenipterus nuchalis*, *Glanidium ribeiroi* e *P. galeatus* (Ravedutti e Júlio Jr., 2001). A utilização da coloração pelo iodeto de propídeo possibilitou maior nitidez na visualização das heterocromatinas de *P. galeatus* deste trabalho em relação às outras espécies de Auchenipteridae anteriormente caracterizadas, como também quando comparadas a de outros Siluriformes. Fenocchio e Bertollo (1992) identificaram blocos heterocromáticos associados às RONS e em região terminal de alguns cromossomos em *Ageneiosus inermis*, enquanto apenas o par das RONS apresentou-se marcado em *Ageneiosus atronatus*. Em relação a essas espécies, uma maior quantidade de heterocromatina também pode ser observada para a espécie do presente trabalho. Os cromossomos B mostraram-se heterocromáticos como na maioria das espécies de peixes neotropicais que apresentavam esse tipo de cromossomo, havendo apenas poucos casos de B totalmente eucromáticos, *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989), *Steindachnerina insculpta* (Oliveira e Foresti, 1993), *Iheringichthys labrosus* (Vissotto *et al.*, 1999), *Characidium cf. zebra* (Venere *et al.*, 1999), *Rhamdia quelen* (Moraes *et al.*, 2007).

A utilização dos fluorocromos Cromomicina A₃ e DAPI, e hibridização *in situ* com sondas de rDNA 5S e 18S já mostraram-se de grande importância em estudos citogenéticos, como na diferenciação de populações (Mantovani *et al.*, 2005), de espécies (Garcia e Moreira-Filho, 2005), na determinação de sistema de cromossomos sexuais (Molina *et al.*, 1998) e em trabalhos com abordagem evolutiva (Vicari *et al.*, 2006) nos diversos grupos de peixes já estudados. Os dados aqui apresentados são os primeiros para Auchenipteridae com esses marcadores, e reforçam a necessidade de sua utilização em estudos posteriores.

Estudos citogenéticos comparativos com outras populações de diferentes bacias hidrográficas podem ser importantes para melhor elucidar a hipótese de que inversões pericêntricas são os principais rearranjos relacionados à evolução em *Parauchenipterus galeatus*. Além disso, microdissecar os cromossomos B aqui apresentados em busca do isolamento de alguma família de DNA satélite seguido de hibridização *in situ* pode ser uma importante ferramenta para gerar informações sobre a evolução cariotípica destes cromossomos B e de *Parauchenipterus galeatus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Abucarma M, Martins-Santos IC (2001) Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguacu basin. *Cytologia* 66: 299–306.
- Akama A, Sarmento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (eds) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, pp 116-120.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, Toledo-Filho SA (1992) Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255–262.
- Andrade SF, Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (1998) Caracterização cariotípica da espécie *Rhamdia* sp. (Pisces, Pimelodidae) proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Londrina, Brazil, B4.

- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006) Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-284.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1: 103-120.
- Borin LA, Martins-Santos IC (1997) Caracterização cariotípica de duas espécies de *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae) da bacia do rio Iguaçu. *Braz. J. Genet* 20 (Suppl), 97.
- Borin LA, Martins-Santos IC (2004) Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the River Iguaçu. *Hereditas* 140: 201–209.
- Born GG (2002) Análise citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces Rhamdiidae) da região sul do Rio Grande do Sul. IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, Brazil, 79.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, pp 195.
- Camacho JPM (1993) Polymorphisms and geographic distribution. Proc. First B Chromosome Conference, Madrid, Espanha, 2-4.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol Sci* 55: 163–178.
- Carvalho RA, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2004) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river, Paraná, Brazil. *Cytologia* 69: 381–385.

- Carvalho RA, Dias AL (2005) Cytogenetic characterization of B chromosomes in two populations of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Capivara reservoir (Paraná, Brazil). *Caryologia* 58: 269–273.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2006) Análise cariotípica em *Megalonema platanum* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Tibagi - PR: possível ocorrência de cromossomo supranumerário. XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics and I International Congress of Fish Genetics, São Carlos, Brazil.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2007) Análise das regiões organizadoras de nucléolo e ocorrência de cromossomo B em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do córrego Tatupeba, Maringá - PR. XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia, Itajaí, Brazil, 01000005.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *J. Fish Biol.* 72: 1907-1932.
- Dawley RM (1989) An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley RM, Bogart JP (eds) *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. University of the State of New York, New York, pp 302.
- Dias AL, Foresti F (1990) Algumas considerações sobre o cariótipo de *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Mogi-Guaçu. III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Botucatu, Brazil, 32.
- Dias AL, Foresti F (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Braz. J. Genet.* 6: 585–600.
- Dias AL, Foresti F, Oliveira C (1998) Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). *Caryologia* 51 (2): 105-113.

- Erdtmann B, Clacagnoto D, Rabolini L, Malabarba LR (1990) Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). *Ciência e Cultura* 42, 452.
- Feldberg E, Porto JIR, Alves-Brinn MN, Mendonça MNC, Benzaquem DC (2004) B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 195-198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1990) Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81: 193–198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69: 41-46.
- Fenocchio AS (1993) Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. Doctoral Thesis, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JP (2000) B Chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* 48: 105–109.
- Fenocchio AS, Swarça AC, Cestari MM, Dias AL (2003) Karyotypic characterization and NOR analysis by different banding techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the first plateau of the Iguacu river (Brazil). *Folia Biologica* 51 (3-4): 219–222.
- Ferraris CJ Jr (2003) Family Auchenipteridae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (eds) Check List of Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris CJ Jr (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.

- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79: 107–114.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49:810-813.
- Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L (2003a). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 68: 403–411.
- Garcia C, Peres WAM, Moreira-Filho O, (2003b) Caracterização cromossômica preliminar de representantes de três famílias de Siluriformes. XLIX Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, Brazil.
- Garcia C (2005) Contribuição aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Master Dissertation, Universidade Federal de São Carlos, Brazil.
- Garcia C, Moreira-Filho O (2005) Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotrop. Ichthyol.* 3 (2): 285-290.
- Garcia C, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF (2006) Estudos cariotípicos preliminares em sete populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) com ênfase na diversidade cromossômica e padrão de bandamento dos cromossomos supranumerários. XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics and I International Congress of Fish Genetics, São Carlos, Brazil.

- Grahl C, Victoriano E (2004) Estudos citogenéticos preliminares em *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Pimelodidae) provenientes do rio do Peixe, município de Videira, Santa Catarina. L Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis, Brazil, GA214.
- Greenwood PH, Rosen DE, Weitzman SH, Myers GS (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 131: 339-456.
- Guilherme LC (2005) Estudos reprodutivos, citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. Doctoral Thesis, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil.
- Hatanaka T, Galetti PM Jr (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122: 239-244.
- Hochberg VBM, Erdtmann B (1988) Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – The occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. Braz. J. Genet. 11: 563–576.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. Experientia 36: 1014-1015.
- Jesus CM, Galetti, PM Jr, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genetica 118: 25-32.
- Jones RN, Rees H (1982) B chromosomes. Academic Press, London.

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2001) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica* 110: 177-183.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2002) Cytogenetic analysis of A- and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): c-banding, silver nitrate and CMA₃ staining and restriction endonucleases banding. *Cytologia* 67: 25–31.
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211-216.
- Martins C, Galetti PM Jr (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom Res* 7: 363-367.
- Maurutto FAM, Noleto RB, Cestari MM (2006) Caracterização citogenética de *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) pertencente à bacia do rio Iguacu. XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics and I International Congress of Fish Genetics. São Carlos, Brazil.
- Mazzuchelli J, Swarça AC, Dias AL (2007) Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 Population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR. *Braz. J. Biol.* 67: 631-633.
- Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini S, Ruiz IGR, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1–9.
- Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC (1997) Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127: 249-253.

- Molina WF, Schmid M, Galetti PM Jr (1998) Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94: 141-149.
- Moraes VPO (2007) Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Master Dissertation. Universidade Estadual de Londrina, Brazil.
- Moraes VPO, Cereali SS, Froehlich O, Dias AL (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 6: 627–633.
- Neo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000a) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108: 211–215.
- Néo DM, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000b) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85: 136-141.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Toledo AS, Foresti F (1988) Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227–236.
- Oliveira C, Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76: 183–186.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo, SA (1993) Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* 46: 171–188.

- Pacheco ACS, Pozzobom AP, Parise-Maltempo PP, Alves AL (2008) Frequência de cromossomos supranumerários em *Corydoras aeneus* (Teleostei: Callichthyidae) identifica variação sexual. XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Uberlândia, Brazil.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 2934-2938.
- Pinna MCC (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds) Phylogeny and classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre, 279-330.
- Prado FD, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2006) Estudo citogenético de *Corydoras aeneus* (Siluriformes, Callichthyidae), coletados em componentes da bacia hidrográfica do Tietê, região de Bauru, SP. XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics and I International Congress of Fish Genetics, São Carlos, Brazil.
- Ravedutti CG, Júlio HF Jr (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. Cytologia 66: 65-70.
- Roman MP, Moreira-Filho O, Margarido VP (2002) O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do rio Iguacu e um caso de triploidia natural. IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, Brazil, 76.
- Salvador LB, Moreira-Filho O (1992) B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Heredity 69: 50-56.

- Sanchez S, Fenocchio AS (1996) Karyotypic studies and cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluroidei) from Argentina. *Cytologia* 61: 247–252.
- Shimabukuro-Dias CK, Oliveira C, Foresti F (2005) Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia* 58 (2): 102-111.
- Schmid M (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 7: 83-103.
- Silva M, Margarido VP (2007) Caracterização cromossômica de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) coletada no rio Piquiri, região de Nova Laranjeiras – Paraná. XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia. Itajaí, Brazil, 01000352.
- Silva SVS, Morelli S (2006) Padrão de coloração de cromomicina A₃ na análise de regiões heterocromáticas em *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do córrego do Bebedouro, Uberlândia – MG. LII Congresso Brasileiro de Genética. Foz do Iguaçu, Brazil, GA308.
- Stivari MK, Martins-Santos IC (2002) Estudo citogenético e ocorrência de variante de cromossomo B em *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae) do rio Aguapeí, SP, Brasil. IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, Brazil, 80.
- Stivari MK, Martins-Santos IC (2004) Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69, 25–34.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

- Treco FR, Malabarba LR, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 6 (1): 87-92.
- Valcarcel A, Brunner P, Maggese, MC (1993) B-Chromosome polymorphism in South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture* 110: 111–118.
- Venere PC, Miyazawa CS, Galetti PM Jr (1999) New Cases of Supernumerary Chromosomes in Characiform Fishes. *Genet. Mol. Biol.* 22 (3): 345-349.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006). Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia* 59: 260-266.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho PM (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of B chromossome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 74: 70-75.
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chrom. Sci.* 3: 9–13.
- Volobujev VT (1981) B-chromosome system of the mammals. *Caryologia* 34: 1-23.

Anexos

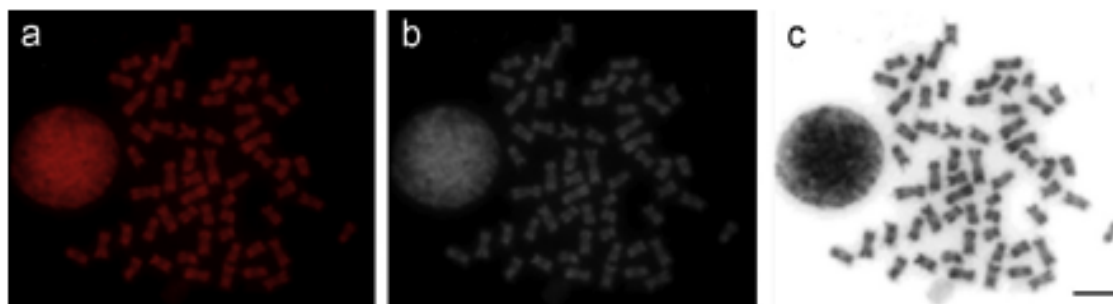


Figura 1 Metáfase de *Parauchenipterus galeatus* tratada pelo bandamento C corada com (a) iodeto de propídeo, (b) convertida para escala de cinza e (c) invertida. Barra = 5 μ m.

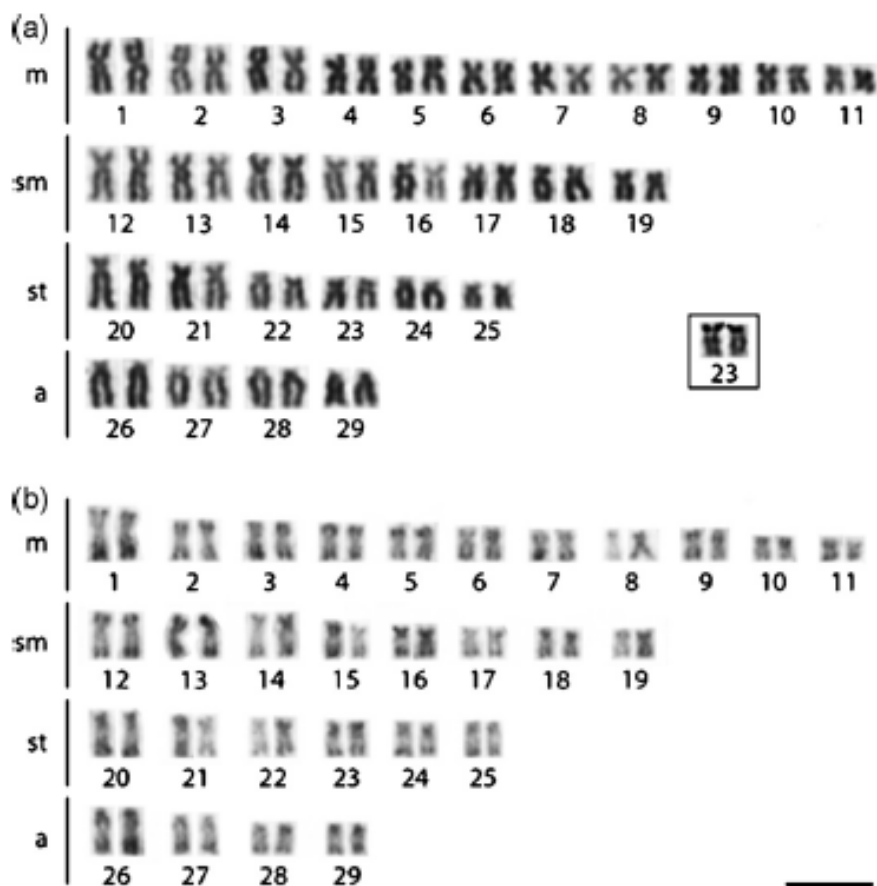


Figura 2 Cariótipo de *Parauchenipterus galeatus* (a) corado com Giemsa e (b) através do bandamento C. Par cromossômico portador das Ag-RONs (Box). Barra = 5 μ m.

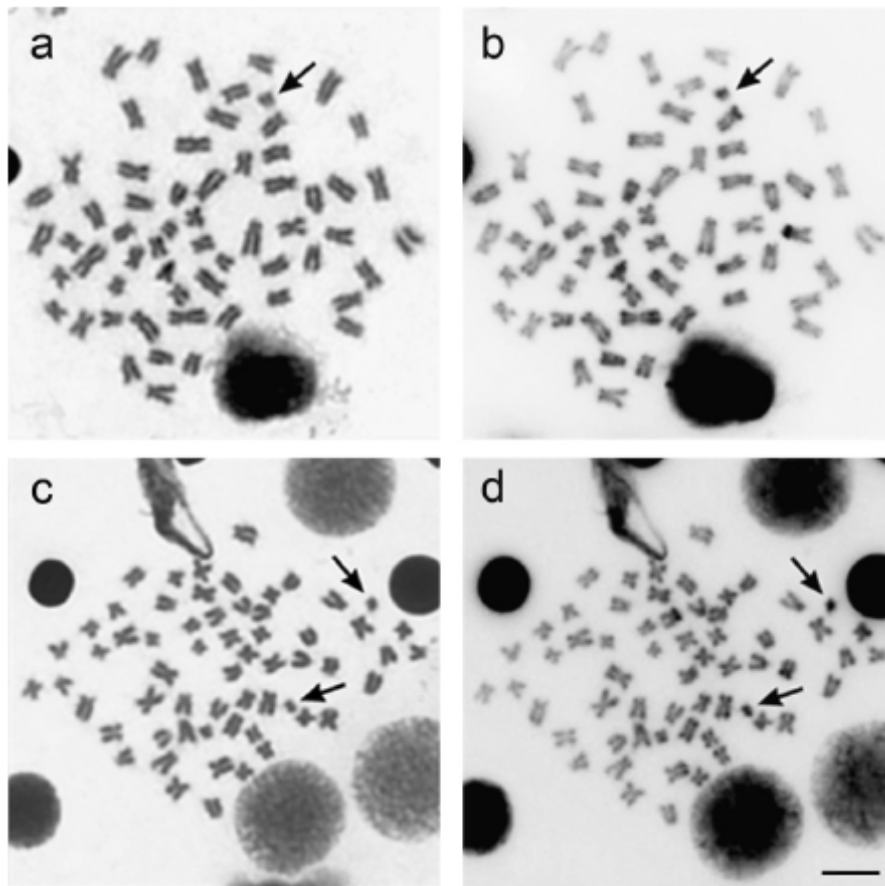


Figura 3 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* coradas com Giemsa (a, c) e seqüencialmente através do bandamento C (b, d). As setas indicam os cromossomos B. Barra = 5 μ m.

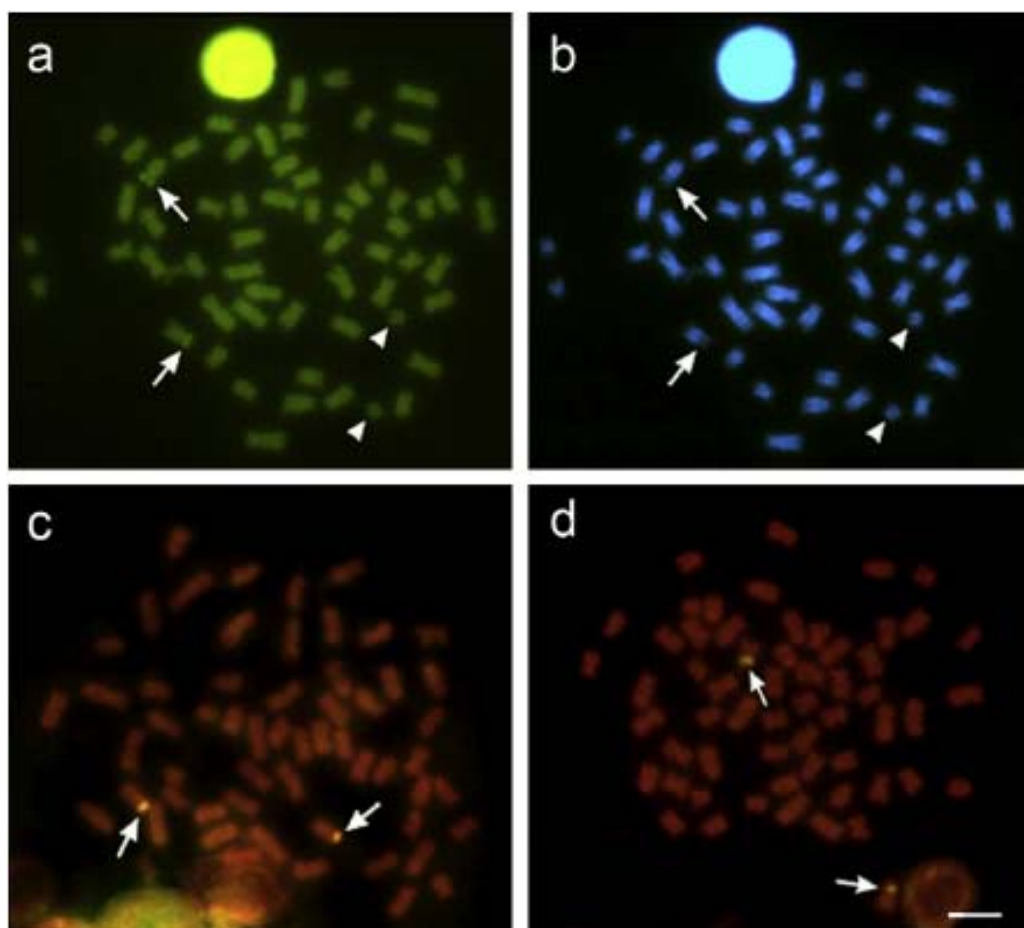


Figura 4 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* coradas (a) pela Cromomicina A₃ e (b) pelo DAPI; as setas indicam o par (23) portador das RONS que possui heterocromatina GC-rica, sendo confirmada pelo DAPI; as cabeças de seta mostram os cromossomos B. Metáfases hibridizadas com (c) sonda de rDNA 18S e (d) sonda de rDNA 5S; as setas indicam o par (23) portador rDNA 18S e o par (16) portador rDNA 5S, respectivamente. Barra = 5µm.

Capítulo II

**Caracterização cromossômica de três populações de *Parauchenipterus galeatus*
(Siluriformes, Auchenipteridae) no Brasil.**

Autores: Roberto Laridondo Lui, Daniel Rodrigues Blanco, Vladimir Pavan Margarido,
Orlando Moreira Filho

Este trabalho está aceito na revista Biological Journal of the Linnean Society

Resumo

Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical, possuindo 20 gêneros e cerca de 90 espécies. *Parauchenipterus galeatus* tem ampla distribuição ocorrendo em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, entre elas, São Francisco. O presente trabalho caracterizou através de técnicas de citogenética básica e molecular três populações de *Parauchenipterus galeatus* das bacias dos rios Paraná, São Francisco e em uma região de conexão natural e antrópica entre essas duas bacias. O número diplóide igual a 58 cromossomos manteve-se constante entre as populações, entretanto, variações na fórmula cariotípica foram detectadas (São Francisco, $22m+16sm+12st+8a$; Piumhi, $20m+16sm+14st+8a$; Paraná, $24m+18sm+8st+8a$). Na população do rio São Francisco foi detectado a presença de cromossomos B. A heterocromatina foi localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos e pericentromérica em alguns cromossomos acrocêntricos nas três populações. Ag-RONs apresentaram-se simples no braço curto de um par subteloentríco nas três populações, variando apenas o par portador deste sítio. Hibridização com sonda de rDNA 18S confirmou o par cromossômico evidenciado pela prata nas três populações. Os sítios de rDNA 5S estão localizados em dois pares cromossômicos submetacêntricos nas três populações variando apenas os pares portadores destas seqüências. No presente trabalho os marcadores cromossômicos clássicos e moleculares, aliados ao contexto histórico natural de formação de bacias hidrográficas, aspectos ecológicos, isolamento geográfico de populações entre as bacias hidrográficas e dentro de uma mesma bacia foram considerados para discutir as possíveis relações biogeográficas entre populações de *P. galeatus* de diferentes localidades.

Palavras-Chave: Citogenética, Biogeografia, rDNA 5S, rDNA 18S

Introdução

Entre os Siluriformes, Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical. Possui 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr. 2007), das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares 2007). Os representantes desta família possuem fertilização interna (Pinna 1998), sendo que algumas espécies apresentam a nadadeira anal transformada em um órgão utilizado para cópula (Britski et al. 1988).

Os estudos citogenéticos em Auchenipteridae são escassos e estão restritos em poucas espécies dos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus*. *Ageneiosus atronasus* e *Ageneiosus inermis* (citado como *A. brevifilis*) possuem número diplóide igual a 56 cromossomos (Fenocchio e Bertollo 1992), enquanto as outras espécies de Auchenipteridae até então estudadas (*Glanidium ribeiroi*, *Parauchenipterus galeatus*, *Auchenipterus osteomystax*, citado como *A. nuchalis*) apresentam 58 cromossomos (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr. 2001; Lui et al. 2009).

Segundo Ferraris Jr. (2003), Auchenipteridae é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae inclui somente os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende todos os 16 gêneros desta família, inclusive *Parauchenipterus*.

Parauchenipterus apresenta ampla distribuição, ocorrendo por toda América do Sul, estando presente nas bacias do Paraná-Paraguai, Amazônica, Orenoco, Guianas, São Francisco e Leste do Brasil. Entretanto, ausente nas drenagens trans-andinas (Akama 2004). *P. galeatus* ocorre em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, como Amazonas, Prata e São Francisco (Akama e Sarmiento-Soares 2007). O presente estudo

está relacionado a exemplares desta espécie nas bacias do rio São Francisco e Paraná no território brasileiro.

A bacia do São Francisco caracteriza-se por ser a única exclusivamente brasileira drenando uma região de 631.133 km² que corresponde a 7,4% do território nacional, sendo a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil (Sato e Godinho 2004). O rio São Francisco inicia seu curso no Planalto de Araxá, correspondendo às nascentes do rio Samburá, e sua foz no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas, percorrendo 2.863 km (Silva et al. 2003). A bacia do rio Paraná tem uma área de 891.000 km² que corresponde a 10,5% da área total do Brasil. O rio Paraná é o décimo maior do mundo e é formado pela união dos rios Paranaíba e Grande na região de Três Lagoas - MS (Agostinho et al. 2004). A bacia do rio Piumhi, um antigo tributário da margem direita do rio Grande que foi transposto para a bacia do rio São Francisco no início dos anos 60, representa uma região de conexão artificial entre essas duas grandes bacias hidrográficas brasileiras, Alto rio Paraná e Alto rio São Francisco (Moreira-Filho e Backup 2005; Moreira-Filho 2006). Além disso, segundo Blanco et al. (2009), anteriormente a esta transposição existia uma região alagadiça que poderia constituir uma possível conexão natural (Pantanal do Cururu) entre as bacias do Piumhi e do São Francisco.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar, através de técnicas de citogenética básica e molecular, diferentes populações de *P. galeatus* das bacias dos rios Paraná, Piumhi e São Francisco, e através destas informações investigar as relações biogeográficas entre estas populações.

Materiais e Métodos

Foram analisados através de técnicas citogenéticas básicas e moleculares exemplares de *P. galeatus* de três populações distintas. Os três pontos de coleta (Fig. 1) estão localizados nos municípios de Lagoa da Prata - MG, bacia do rio São Francisco (7 fêmeas e 3 machos), Capitólio - MG, antigo Pantanal do Cururu na bacia do rio Piumhi (9 fêmeas e 12 machos), e Três Lagoas – MS, Reservatório de Jupia, bacia do rio Paraná (7 fêmeas e 11 machos). Os exemplares da população de Lagoa da Prata - MG foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e estão catalogados com o número MZUSP 100985. Os exemplares das outras duas populações serão posteriormente catalogados.

A preparação da suspensão celular de cromossomos mitóticos foi obtida a partir de células do rim anterior (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1993). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão de distribuição de heterocromatina foi determinado através do método descrito por Sumner (1972) com modificações descritas por Lui et al. (2009), em lâminas previamente analisadas com coloração convencional Giemsa, as quais foram descoradas em fixador (3 metanol : 1 ácido acético) e submetidas ao bandamento C (análise seqüencial). As regiões organizadoras de nucléolos ativas na intérfase precedente foram identificadas utilizando impregnação pelo nitrato de Prata (Howell e Black 1980), e esta preparação também foi efetuada em metáfases anteriormente coradas por Giemsa (análise seqüencial).

A obtenção das sondas de rDNA 18S e 5S do genoma de *Parauchenipterus galeatus* foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o método descrito por Sambrook et al. (1989).

Para amplificação do rDNA 5S foram utilizados os *primers* construídos a partir da sequência do rRNA 5S de *Salmo gardnerii*, descrita por Komiya & Takemura (1979) e a reação de PCR foi realizada de acordo com Pendás et al. (1994) contendo 2,5 uL PCR Buffer 10x, 0,75 uL MgCl₂ (50mM), 3,2 uL dNTPs (1,25 mM), 0,5 uL de cada *primer* (10 uM), 1 uL DNA (80 ng/uL), 0,1 uL Taq Polimerase (5 U/uL) e 16,45 uL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 2 ciclos de 95°C (1 min), 61°C (30 seg), 72°C (45 seg), 2 ciclos de 95°C (1 min), 59°C (30 seg), 72°C (45 seg), 2 ciclos de 95°C (1 min), 57°C (30 seg), 72°C (45 seg), 25 ciclos de 95°C (1 min), 61°C (30 seg), 72°C (45 seg), seguido por 72°C (7 min).

Para amplificação do rDNA 18S foram utilizados os *primers* 18SF/18SR conforme descrito por Cioffi et al. (2009) e a reação de PCR foi realizada contendo 2,5 uL PCR Buffer 10x, 0,75 uL MgCl₂ (50mM), 3,2 uL dNTPs (1,25 mM), 0,5 uL de cada *primer* (10 uM), 1 uL DNA (80 ng/uL), 0,1 uL Taq Polimerase (5 U/uL) e 16,45 uL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 35 ciclos de 95°C (1 min), 60°C (1 min), 72°C (45 seg), seguido por 72°C (7 min).

A hibridização *in situ* fluorescente - FISH foi realizada segundo Pinkel et al. (1986). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation* segundo as instruções do fabricante (*Bionick Labelling System* - Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando o conjugado avidina-FITC e anti-avidina biotina (Sigma). Os cromossomos foram contra-corados com solução de iodeto de propídeo/*antifading* (50 µg/mL) e analisados em microscópio de

epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software *Image-Pro Plus* versão 6.3 (Media Cybernetics).

Resultados

Parauchenipterus galeatus - Bacia do rio São Francisco (Alto São Francisco)

O número diplóide encontrado foi de 58 cromossomos para ambos os sexos, apresentando 22 cromossomos metacêntricos, 16 submetacêntricos, 12 subtelocêntricos e 8 acrocêntricos, $NF = 108$ (Fig. 2a). Não foi observado heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. Foi detectada a presença de cromossomos B do tipo metacêntrico apresentando variação intra- e inter-individual de 0 a 2 (Fig. 2a, box).

A heterocromatina está localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos, com marcação bitelomérica em alguns cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, e pequenos blocos pericentroméricos em alguns cromossomos acrocêntricos. Os cromossomos B mostraram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 2b).

As Ag-RONs apresentaram-se simples em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 23 (Fig. 2a, box). A hibridização com sonda de rDNA 18S também evidenciou um único par cromossômico portador destes sítios (Fig. d), correspondente ao evidenciado pelo nitrato de prata. A sonda de rDNA 5S mostrou sítios em posição intersticial no braço curto do par submetacêntrico 16 e intersticial no braço longo do par submetacêntrico 17 (Fig. 3a).

Parauchenipterus galeatus - Bacia do rio Piumhi

O número diplóide encontrado foi de 58 cromossomos para ambos os sexos, apresentando 20 cromossomos metacêntricos, 16 submetacêntricos, 14 subtelocêntricos e 8 acrocêntricos, $NF = 108$ (Fig. 2c). Não foi observado heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo.

A heterocromatina está localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos, com marcação bitelomérica em alguns cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, e pequenos blocos pericentroméricos em alguns cromossomos acrocêntricos (Fig. 2d).

As Ag-RONs apresentaram-se simples em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 24 (Fig. 2c, box). A hibridização com sonda de rDNA 18S evidenciou um único par cromossômico portador destes sítios (Fig. 3e), correspondente ao evidenciado pelo nitrato de prata. A sonda de rDNA 5S mostrou sítios em posição intersticial no braço curto do par submetacêntrico 15 e intersticial no braço longo do par submetacêntrico 16 (Fig. 3b).

Parauchenipterus galeatus - Bacia do rio Paraná (Alto Paraná)

O número diplóide encontrado foi de 58 cromossomos para ambos os sexos, apresentando 24 cromossomos metacêntricos, 18 submetacêntricos, 8 subtelocêntricos e 8 acrocêntricos, $NF = 108$ (Fig. 2e). Não foi observado heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo.

A heterocromatina está em posição terminal de quase todos os cromossomos, com marcação bitelomérica em alguns cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e

subtelocêntricos, e pequenos blocos pericentroméricos em alguns cromossomos acrocêntricos (Fig. 2f).

As Ag-RONs apresentaram-se simples em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 25 (Fig. 2e, box). A hibridização com sonda de rDNA 18S evidenciou um único par cromossômico portador destes sítios (Fig. 3f), correspondente ao evidenciado pelo nitrato de prata. A sonda de rDNA 5S mostrou sítios em posição intersticial no braço curto do par submetacêntrico 16 e intersticial no braço longo do par submetacêntrico 17 (Fig. 3e).

Discussão

Aspectos Citogenéticos

O número diplóide encontrado para as três populações de *Parauchenipteus galeatus* estudadas não variou, sendo igual a 58 cromossomos. O número fundamental (NF = 108) também foi o mesmo, uma vez que foi encontrada a mesma quantidade de cromossomos acrocêntricos. Entretanto, foi verificada variação na fórmula cariotípica entre essas populações (Fig. 2). *Parauchenipteus galeatus* da bacia do Alto rio Paraná, região de Porto Rico, foi anteriormente caracterizada através de técnicas citogenéticas básicas e $2n = 58$ também foi verificado, porém com distinta fórmula cariotípica (Ravedutti e Júlio Jr. 2001). Casos em que diferentes populações de uma determinada espécie possuem o mesmo número diplóide com variação na fórmula cariotípica são comuns em peixes neotropicais, como pode ser observado em *Pimelodus maculatus* (Toledo e Ferrari 1976; Dias e Foresti 1993; Vissotto et al. 1999; Swarça et al. 2001; Borin e Martins-Santos 2002; Souza et al. 2003; Garcia e Moreira-Filho 2005; Mazzuchelli et al. 2007; Treco et al. 2008), *Rhamdia quelen* (Hochberg e Erdtmann 1988; Fenocchio et al. 2000; Fenocchio et al. 2003a, b; Stivari e Martins-Santos 2004; Moraes et al. 2007), *Hypostomus ancistroides* (Michele et al. 1977; Artoni e Bertollo 1996; Alves 2006), *Oligosarcus hepsetus* (Falcão e Bertollo 1985; Centofante et al. 2006), entre outros. Tais diferenças devem estar relacionadas principalmente a rearranjos cromossômicos do tipo inversões pericêntricas e/ou translocações.

O padrão de distribuição de heterocromatina mostrou-se muito semelhante nas três populações de *P. galeatus*, não podendo ser utilizado como um bom marcador populacional. Diferentemente deste, em *Leporinus elongatus* o bandamento C foi considerado um importante marcador, útil na identificação de subdivisão populacional desta espécie na bacia do Alto rio Paraná (Molina et al. 2008).

Para as três populações analisadas no presente trabalho foi detectada Ag-RONs simples localizada em posição terminal de cromossomos subtelocêntricos, ocorrendo variação apenas quanto ao número do par portador destes sítios (Fig. 2). Tal diferença deve-se às variações nas fórmulas cariotípicas anteriormente citadas, já que a morfologia dos pares portadores dos sítios de rDNA 18S e sua posição no cromossomo sugere tratar-se do mesmo par cromossômico, homeólogo entre as populações. Já em *P. galeatus* da região de Porto Rico do rio Paraná os sítios de rDNA 18S estão presentes em um par acrocêntrico (Ravedutti e Júlio Jr. 2001). Rearranjo cromossômico do tipo inversão pericêntrica pode ser responsável por esta diferença. A FISH com sonda rDNA 18S também evidenciou apenas um par subtelocêntrico portador desta seqüência nas três populações (Fig. 3d, 3e, 3f) analisadas, confirmando os dados encontrados através da impregnação com o nitrato de prata.

Em relação aos sítios de rDNA 5S foram detectados dois pares submetacêntricos com marcação intersticial em cada uma das três populações. O número de sítios de 5S apresenta-se conservado entre as populações, ocorrendo variação apenas relacionada ao número dos pares evidenciados. Esta variação pode ser consequência das distintas fórmulas cariotípicas, uma vez que a posição intersticial no braço curto/longo dos pares 16/17, 15/16 e 16/17 das populações do São Francisco, Piumhi e Paraná, respectivamente, indicam tratar-se dos mesmos pares cromossômicos, homeólogos entre as populações (Fig. 3a, 3b, 3c). Lui et al. (2009) evidenciaram apenas um par submetacêntrico (16) portando sítios de rDNA 5S em posição intersticial no braço curto da população do São Francisco, não sendo verificado a presença do par 17, conforme mostrado no presente trabalho. É importante ressaltar que o sítio de 5S presente intersticialmente no braço longo do par 17 da população do São Francisco parece apresentar um número menor de cópias em relação ao par 16, que é sugerido por um

menor sinal de marcação (Fig. 3a), o que explicaria a não identificação pelos autores naquele trabalho.

Aspectos Ecológicos e Biogeográficos

A região de transposição do rio Piumhi exemplifica interessantes casos em que algumas espécies de peixes foram apenas incorporadas à bacia do rio São Francisco, enquanto outras invadiram e estão se expandindo da região de transposição para dentro da bacia do São Francisco. *Leporinus octofasciatus* está sendo considerado um interessante indicador biogeográfico relacionado a esse caso de transposição, uma vez que essa espécie era restrita a bacia do Alto rio Paraná e está sendo encontrada dentro do São Francisco (Moreira-Filho e Buckup 2005). O cariomorfo A de *Hoplias malabaricus*, característico do Alto rio Paraná, representa outro caso de invasão, sendo encontrado desde o canal de transposição do rio Piumhi até a região de Três Marias - MG (Blanco et al. 2009). Além disso, os autores sugerem que o cariomorfo F, característico do São Francisco, está sendo deslocado para outras regiões desta bacia, não sendo encontrado nos afluentes do São Francisco presente na região de transposição, onde anteriormente ocorria.

Representantes da família Parodontidae também foram estudados nesta região de transposição. Com exceção à *Parodon hilarii* que é endêmica da bacia do rio São Francisco, as outras três espécies do Alto rio Paraná estudadas deste grupo foram consideradas invasoras a esta bacia, *Apareiodon piracicabae*, *Apareiodon ibitiensis* e *Parodon nasus* (Silva 2009).

Para o gênero *Astyanax*, outros dois exemplos foram descritos: o cariomorfo A de *Astyanax fasciatus*, característico da bacia do Alto rio Paraná, também foi encontrado no canal de transposição do rio Piumhi e em afluentes pertencentes à bacia do rio São

Francisco, onde estava presente apenas o cariomorfo B característico da bacia do rio São Francisco, representando mais um caso de invasão (Peres et al. 2009); outro estudo nesta região de transposição ocorreu com *A. altiparanae* (Alto rio Paraná) e *A. lacustris* (Alto rio São Francisco), em que espécies teoricamente distintas (Garutti e Britski 2000), devido a suas localizações em diferentes bacias hidrográficas, foram colocadas em simpatria e estão formando híbridos, indicando tratar-se da mesma unidade taxonômica, *Astyanax bimaculatus* (Peres 2009).

As três populações de *P. galeatus* analisadas no presente trabalho apresentaram poucas diferenças citogenéticas, sendo estas restritas apenas às fórmulas cariotípicas (Tab. 1, Fig. 1). De maneira geral, é possível verificar que a população do rio São Francisco e da bacia do rio Piumhi mostraram-se mais semelhantes entre si quando comparadas à do rio Paraná (Reservatório de Jupia). Este fato pode ser explicado pela antiga existência de um alagadiço (Pantanal do Cururu) na região da transposição que possivelmente conectava a bacia do rio Piumhi à bacia do Alto rio São Francisco, e que deve ter possibilitado que em épocas remotas o fluxo gênico entre as populações dos rios São Francisco e Piumhi tenha se mantido por mais tempo quando comparada a população do Alto rio Paraná (Reservatório de Jupia), e que possa ter divergido posteriormente. A existência de cromossomos B na população do rio São Francisco pode ser considerada um marcador populacional, visto que este elemento está ausente na população do rio Piumhi. Segundo Lui et al. (2009), a ocorrência de B pode estar relacionada a um conjunto de fatores ambientais favoráveis a existência desses cromossomos, aliado a uma possível redução do fluxo gênico, que explicaria a alta frequência de B nesta população e sua ausência em outras populações já estudadas desta espécie.

Tabela 1 Dados citogenéticos de diferentes populações de *Parauchenipterus galeatus*.

Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	Cromossomos B	Ag-RONs	Referências
Bacia do São Francisco, Lagoa da Prata, MG, Brasil	58	22m+16sm+12st+8a	Presente	s, sa, par 23, st	Presente trabalho
Bacia do Piumhi, Capitólio, MG, Brasil	58	20m+16sm+14st+8a	Ausente	s, sa, par 24, st	Presente trabalho
Reservatório de Jupiá, Três Lagoas, MS, Brasil	58	24m+18sm+8st+8a	Ausente	s, sa, par 25, st	Presente trabalho
Rio Paraná, Porto Rico, PR, Brasil	58	22m+12sm+6st+18a	Ausente	s, sa, par 23, a	Ravedutti e Júlio Jr. (2001)

s=simples; sa=braço curto; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico.

P. galeatus é considerada uma espécie demersal/sedentária, sendo mais frequentemente encontrada em lagos, lagoas e pântanos e com boa adaptação a ambientes hipóxicos (Froese e Pauly 2009). Estas características diminuem a probabilidade de que tenha se dispersado como outras espécies com hábitos migratórios que foram estudadas nesta região de transposição e estão sendo consideradas invasoras para a bacia do São Francisco.

Após a construção hidroelétrica de FURNAS, no estado de Minas Gerais, que foi uma das primeiras grandes usinas do Brasil (Moreira-Filho 2006), várias outras hidroelétricas foram posteriormente construídas. Até essa época, a bacia do Alto rio Paraná era constituída por uma série de quedas e cachoeiras que foram sendo inundadas ao longo do tempo devido à construção de hidroelétricas. As antigas quedas e cachoeiras possivelmente funcionavam como efetivas barreiras naturais para a espécie em estudo, formando isolados populacionais dentro da bacia do Alto rio Paraná. O fato da população presente na bacia do rio Paraná (Reservatório de Jupia) ter se mostrado a mais diferente entre as três analisadas pode ser explicado por esse conjunto de barreiras naturais historicamente existentes e que nos últimos 50 anos deixaram de existir devido a construção dessas hidroelétricas.

Lowe-McConnell (1999) afirma que sistema de rios tropicais de grande porte permite que algumas espécies de peixes desenvolvam isolamento geográfico nas cabeceiras dos tributários, e que as barreiras entre as populações podem ser físicas, químicas ou bióticas. Movimentos tectônicos levam ao rejuvenescimento de rios, fazendo com que trechos de corredeiras não fiquem limitados às cabeceiras e se alternem ao longo dos cursos dos rios com trechos tipo lagos. Tais alterações nas condições ecológicas permitem isolamento microgeográfico dentro de um mesmo sistema hidrográfico, com as várias espécies de alguns grupos de peixes limitando-se a

diferentes trechos do rio. Outras espécies apresentam distribuição extremamente ampla, de um sistema de rios para outro; outras parecem ter distribuição muito restrita. Segundo Margalef (1977), a evolução conduz à estabilização das populações, combinando recursos coexistentes distintos em segmentos de espaço e tempo, correspondendo desta forma às propriedades do ambiente e as características das espécies. Dessa forma, as pequenas diferenças entre as populações de *P. galeatus* devem estar relacionadas ao conjunto desses fatores, como principalmente, ao isolamento geográfico aliado ao tempo de separação/divergência entre tais populações.

Uma população de *P. galeatus* da bacia do rio Paraná, região de Porto Rico (Ravedutti e Júlio Jr. 2001) foi anteriormente analisada por técnicas citogenéticas e uma fórmula cariotípica distinta das três deste trabalho foi encontrada (Tab. 1). Segundo Pavanelli e Graça (2007), essa espécie era considerada restrita a região abaixo de Sete Quedas no rio Paraná até o ano de 1982, quando ocorreu a inundação para formação do reservatório da hidrelétrica de Itaipu permitindo a ascensão desses indivíduos para o Alto rio Paraná. Porém, a fórmula cariotípica detectada para a população presente no Reservatório de Jupia (rio Paraná) é distinta (Tabela 1, Fig. 2) à descrita por Ravedutti e Júlio Jr. (2001) para a população de Porto Rico (rio Paraná, aproximadamente 290 Km abaixo do reservatório de Jupia). Essas diferenças sugerem que *P. galeatus* já existia na bacia do rio Paraná acima da região de Sete Quedas, sendo que até 1982 não deve ter ocorrido relato de exemplares coletados.

O isolamento de peixes de água doce aos seus sistemas hidrográficos estreita o relacionamento entre as histórias naturais da ictiofauna e das bacias as quais pertencem. As alterações que ocorrem nas bacias e seus tributários, por motivos naturais ou ações antrópicas, influenciam todo o ecossistema, tornando peculiar a história natural das populações que a compõem. Segundo Castro (1999), a maioria das espécies de peixes

de pequeno porte apresenta capacidade de deslocamento relativamente restrita dentro de grandes bacias hidrográficas. Além disso, para praticamente todos os peixes, extensões de terra seca podem constituir barreiras intransponíveis, sendo possível imaginar que, ao longo dos milhões de anos durante a evolução dos peixes neotropicais, um grande número de alterações geográficas e ecológicas tenha ocorrido nos sistemas hídricos, gerando numerosos exemplos de vicariância, que poderiam explicar a diversidade encontrada entre as populações de *P. galeatus* mostradas neste trabalho, e de tantas outras espécies de peixes anteriormente estudadas. Além disso, o modo de vida sedentário desta espécie, acompanhado de um baixo/ausente fluxo gênico entre as populações, facilitaria a fixação de rearranjos cromossômicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares e aos técnicos de laboratório Luis Henrique da Silva, Pedro Luis Gallo e Alcídio Culósio Filho pelo auxílio em coletas. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos 07/57302-8 e 08/54620-1) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I., Júlio Jr., H.F. (2004) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, (eds. J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, A. Baer). IDRC publications, 380 pp.
- Akama, A. (2004) *Sistemática dos gêneros Parauchenipterus Bleeker, 1862 e Trachelyopterus Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae)*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 375 pages.
- Akama, A., Sarmiento-Soares, L.M. (2007) Família Auchenipteridae. In: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. (eds P.A. Buckup, N.A. Menezes, M.S. Ghazzi), Série Livros 23. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 116-120.
- Alves, A.L., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A., Foresti, F. (2006) Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 128, 1-9.
- Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C. (1996) Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia* 49, 81-90.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1, 103–120.
- Blanco, D.R., Lui, R.L., Bertollo, L.A.C., Diniz, D., Moreira-Filho, O. (2009) Characterization of invasive fish species in a river transposition region:

- evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, in press.
- Borin, L.A., Martins-Santos, I.C. (2002) Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná basin. *Cytologia* 67, 199-204.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S. (1988) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. Câmara do Deputados/CODEVASP, Brasília, 143 pp.
- Castro, R.M.C. (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: *Ecologia de Peixes de Riachos*. (eds E.P. Caramaschi, R. Mazzoni, P.R. Peres-Neto). Séria Oecologia Brasiliensis, vol. VI, Rio de Janeiro, pp. 139-155.
- Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2006) Chromosomal differentiation between populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from small tributaries at opposite margins of the Paraíba do Sul river (Brazil). *Brazilian Archives Biology and Technology* 49, 981-987.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U., Bertollo, L.A.C. (2009) Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic Genome Research*, in press.
- Dias, A.L., Foresti, F. (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Brazilian Journal of Genetics* 6, 585-600.
- Falcão, J.N., Bertollo, L.A.C. (1985) Chromosome characterization in Ancestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). *Journal of Fish Biology* 27, 603-610.

- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios* 69, 41-46.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Camacho, J.P. (2000) B Chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* 48, 105–109.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Dias, A.L., Swarça, A.C. (2003a) Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia* 68, 363-368.
- Fenocchio, A.S., Swarça, A.C., Cestari, M.M., Dias, A.L. (2003b) Karyotypic characterization and NOR analysis by different banding techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the first plateau of the Iguaçú river (Brazil). *Folia Biologica (Kraków)* 51, 219-222.
- Ferraris Jr., C.J. (2003) Family Auchenipteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. (eds R.E. Reis, S.O. Kullander, C.J. Ferraris Jr.) Edipucrs, Porto Alegre, pp. 470-482.
- Ferraris Jr., C.J. (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418, 1-628.
- Foresti, F., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F. (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49, 810–813.
- Froese, R., Pauly, D. (2009) FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em 21 de junho.
- Garcia, C., Moreira-Filho, O. (2005) Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco:

- considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology* 3, 285–290.
- Garutti, V., Britski, H.A. (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu Ciência e Tecnologia, Série Zoologia* 13, 65-88.
- Hochberg, V.B.M., Erdtmann, B. (1988) Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) - the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Brazilian Journal of Genetics* 11, 563–576.
- Howell, W.M., Black, D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015.
- Komiya, H., Takemura, S. (1979) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*. 86, 1067–1080.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52, 201–220.
- Lowe-McConnell, R.H. (1999) *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*, 1 ed. Edusp, São Paulo, 536 pp.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Margarido, V.P., Moreira-Filho, O. (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40, 552-559.
- Margalef, R. (1977) *Ecologia*. Ediciones Omega, Barcelona. 951 pp.

- Mazzuchelli, J., Swarça, A.C., Dias, A.L. (2007) Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 Population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR. *Brazilian Journal of Biology* 67, 631–633.
- Michele, J.L., Takahashi, C.S., Ferrari, I. (1977) Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia* 42, 539-546.
- Molina, W.F., Shibatta, O., Galetti Jr., P.M. (2008) Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology* 31, 270-274.
- Moraes, V.P.O., Cereali, S.S., Froehlich, O., Dias, A.L. (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 6, 627–633.
- Moreira-Filho, O. (2006) Uma transposição esquecida. *Revista Universidade Federal de Goiás* VIII,77–82.
- Moreira-Filho, O., Buckup, P.A. (2005) A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Parana' River basins. *Neotropical Ichthyology* 3,449–452.
- Pavanelli, C.S., Graça, W.J. (2007) *Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes*. Eduem, Maringá, 241 pp.
- Pendás, A.M., Morán, P., Freije, J.P., Garcia-Vazquez, E. (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic *Salmo* 5S rDNA. *Cytogenetic and Cell Genetics* 67, 31–36.

- Peres, W.A.M. (2009) *Análise citogenética de espécies de Astyanax (Characiformes) da região de transposição do rio Piumhi*. PhD thesis, Universidade Federal de São Carlos, 89 pages.
- Peres, W.A.M., Buckup, P.A. Kantek, D.L.Z., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2009) Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica*, in press.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 83, 2934–2938.
- Pinna, M.C.C. (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, C.A.S. Lucena). Edipucrs, Porto Alegre, pp. 279-330.
- Ravedutti, C.G., Júlio Jr., H.F. (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66, 65-70.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato, Y., Godinho, H.P. (2004) Migratory fishes of the São Francisco river. In: *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, (eds J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, A. Baer). IDRC publications, 380 pp.
- Silva, E.B. (2009) *Citogenética Clássica e Molecular em peixes neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio*. PhD thesis, Universidade Federal de São Carlos, 167 pages.

- Silva, P.A., Vieira, G.G., Farinasso, M., Carlos, R.J. (2003) Determinação da extensão do rio São Francisco. In: *XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto* (Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Belo Horizonte, 05-10 de abril, 2003). Belo Horizonte, pp. 393-400.
- Souza, L., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2003) Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from Paraguai river basin. *Cytologia* 68 (4), 345-350.
- Stivari, M.K., Martins-Santos, I.C. (2004) Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69, 25–34.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75, 304–306.
- Swarça, A.C., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2001) Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 110, 97-100.
- Toledo, V., Ferrari, I. (1976) Estudo citogenético de três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). *Científica* 4, 101-106.
- Treco, F.R., Malabarba, L.R., Giuliano-Caetano, L., Dias, A.L. (2008) Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6 (1), 87–92.
- Vissotto, P.C., Foresti, F., Oliveira, C., (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3, 9–13.

Anexos

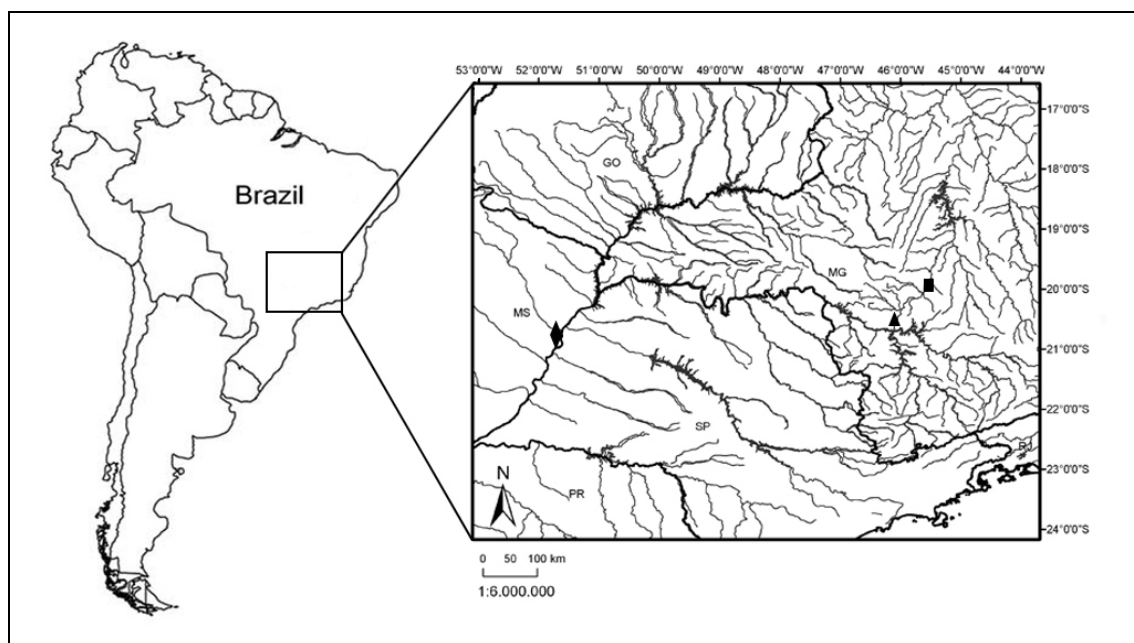


Figura 1 Mapa dos pontos de coleta amostrados, (Quadrado) bacia do rio São Francisco, Lagoa da Prata - MG, (Triângulo) bacia do rio Piumhi, Capitólio - MG, (Losango) bacia do rio Paraná, Três Lagoas - MS.

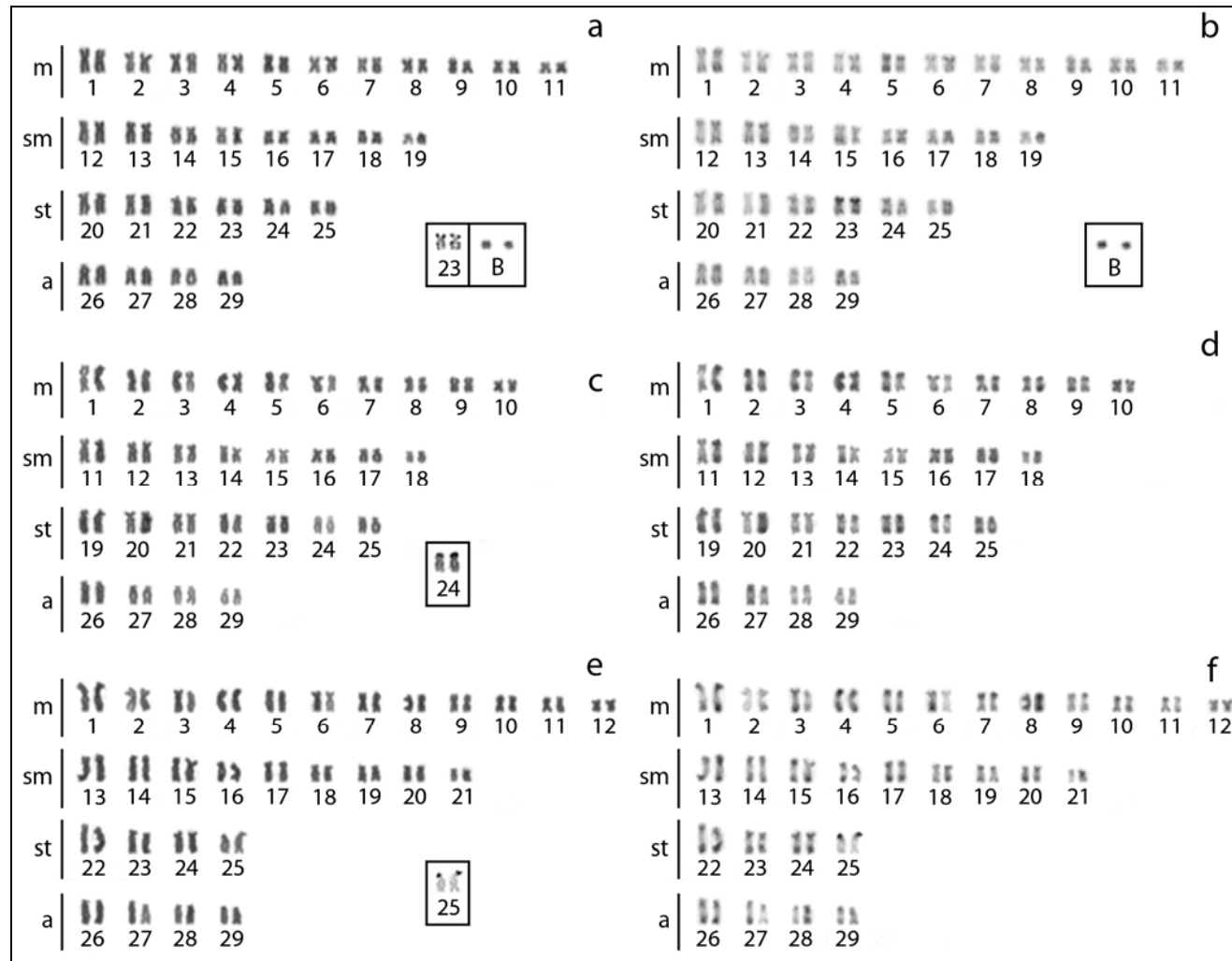


Figura 2 Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* das populações dos rios São Francisco (a, b), Piumhi (c, d) e Paraná (e, f) corados com Giemsa (a, c, e) e através do bandamento C (b, d, f). No Box são visualizados os cromossomos portadores das Ag-RONs e cromossomos B das respectivas populações.

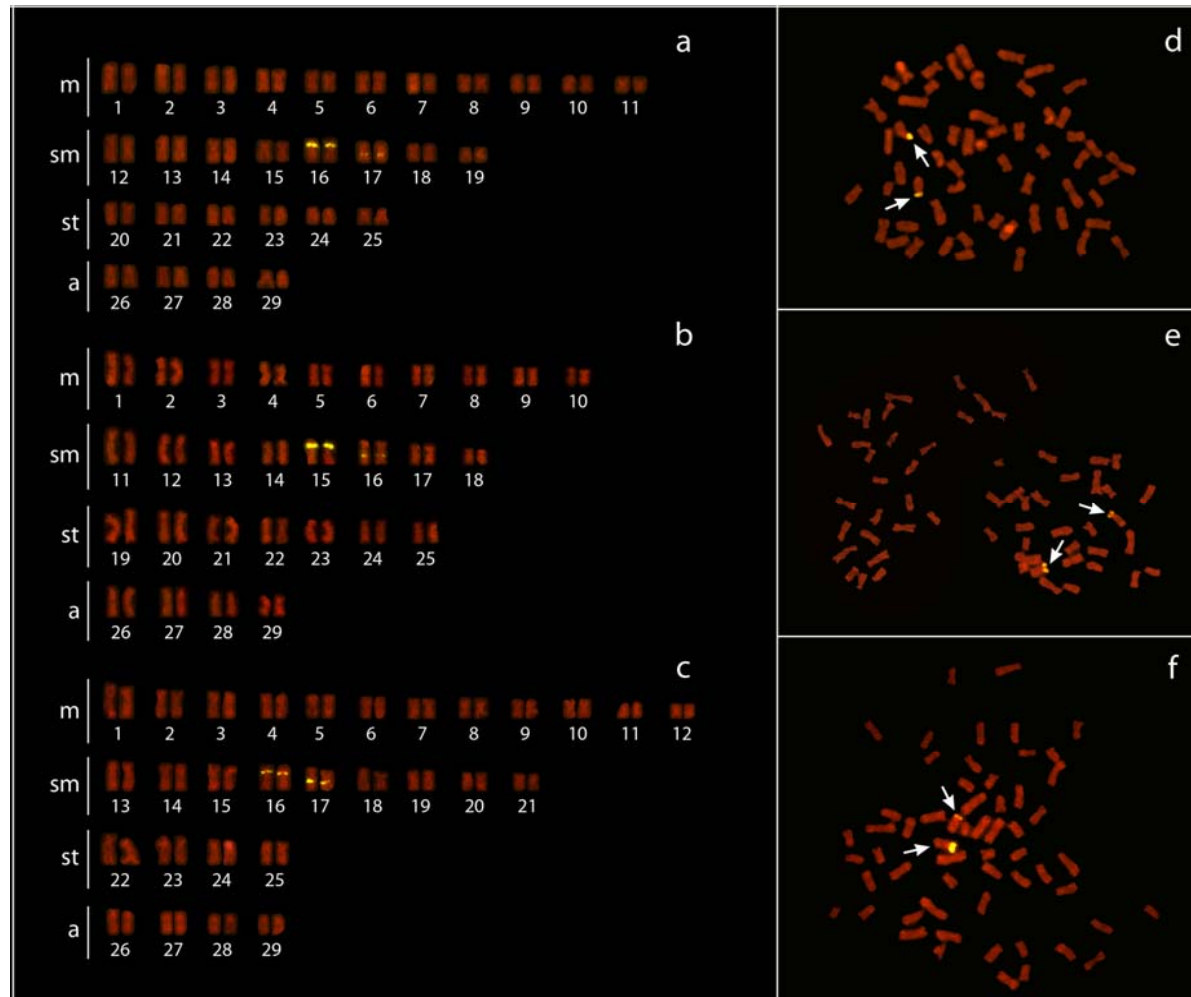


Figura 3 Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* hibridizados com sonda de rDNA 5S das populações do rio São Francisco (a), Piumhi (b) e Paraná (c). Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* hibridizadas com sonda de rDNA 18S das populações dos rios São Francisco (d), Piumhi (e) e Paraná (f).

Capítulo III

**Análise da região controle do mtDNA de populações de *Parauchenipterus galeatus*
(Siluriformes, Auchenipteridae) de três bacias hidrográficas.**

Resumo

Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical, possuindo 20 gêneros e cerca de 90 espécies, das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro. *Parauchenipterus galeatus* ocorre em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, como Amazonas, Prata e São Francisco. A bacia do São Francisco caracteriza-se por ser a única exclusivamente brasileira drenando uma região que corresponde a 7,4% do território nacional, sendo a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil. A bacia do rio Paraná tem uma área de 891.000 km² que corresponde a 10,5% da área total do Brasil. A bacia do rio Piumhi, um antigo tributário da margem direita do rio Grande que foi transposto para a bacia do rio São Francisco no início dos anos 60, representa uma região de conexão artificial entre essas duas grandes bacias hidrográficas brasileiras, Alto rio Paraná e Alto rio São Francisco. O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e inter-específicas e está sendo amplamente utilizado em estudos com diversos organismos. A região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) é muito utilizada para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações de uma única espécie. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar, através do seqüenciamento desta região do DNA mitocondrial, três populações de *P. galeatus* das bacias dos rios Paraná, São Francisco e Piumhi, analisando os possíveis processos de similaridade e/ou divergência e sua correlação com a distribuição geográfica, além de verificar os possíveis efeitos que a transposição do rio Piumhi pode ter causado para a espécie estudada. Um fragmento de aproximadamente 1200 pares de base (pb) foi amplificado em todos os exemplares das três populações da espécie em estudo, sendo que, após a edição e alinhamento das sequências um fragmento de 847 pb foi obtido para as

posteriores análises. Foram detectados 65 sítios polimórficos entre as três populações com uma baixa diversidade genética para as populações do rio São Francisco e Piumhi e uma diversidade maior genética para a população do rio Paraná. As três populações apresentaram altos valores de *Fst* que indicam forte estruturação populacional. Além disso, distância genética entre as populações mostra uma maior proximidade entre as populações do São Francisco e do Piumhi do que em relação à do Paraná.

Palavras-Chave: Alto Paraná, São Francisco, Transposição de rio, *D-loop*.

Introdução

Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical. Possui 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr., 2007), das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama & Sarmiento-Soares, 2007). Os representantes desta família possuem fertilização interna (Pinna, 1998), sendo que algumas espécies apresentam a nadadeira anal transformada em um órgão utilizado para cópula (Britski *et al.*, 1988). Segundo Ferraris Jr. (2003), Auchenipteridae é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae inclui somente os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende todos os 16 gêneros desta família, inclusive *Parauchenipterus*.

Parauchenipterus apresenta ampla distribuição, ocorrendo por toda América do Sul, estando presente nas bacias do Paraná-Paraguai, Amazônica, Orenoco, Guianas, São Francisco e Leste do Brasil, e ausente nas drenagens trans-andinas (Akama, 2004). *Parauchenipterus galeatus* ocorre em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, como Amazonas, Prata e São Francisco (Akama & Sarmiento-Soares, 2007).

A bacia do São Francisco caracteriza-se por ser a única exclusivamente brasileira correspondendo a 7,4% do território nacional, sendo a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil (Sato & Godinho, 2004). O rio São Francisco inicia seu curso no Planalto de Araxá, correspondendo às nascentes do rio Samburá, e sua foz no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas, percorrendo 2.863 km (Silva *et al.*, 2003). A bacia do rio Paraná ocupa 10,5% da área total do Brasil, sendo o rio Paraná, o décimo maior do mundo e sendo formado pela união dos rios Paranaíba e Grande na região de Três Lagoas - MS (Agostinho *et al.*, 2004). A bacia do rio Piumhi, um antigo tributário da margem direita do rio Grande que foi transposto para a bacia do rio São

Francisco no início dos anos 60, representa uma região de conexão artificial entre essas duas grandes bacias hidrográficas brasileiras, Alto rio Paraná e Alto rio São Francisco (Moreira-Filho & Buckup, 2005; Moreira-Filho, 2006). Segundo Blanco *et al.* (2009), antes de ocorrer esta transposição existia uma região alagadiça que poderia constituir uma possível região de contato (Pantanal do Cururu) para algumas espécies de peixes entre as bacias do Piumhi e do São Francisco.

O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e inter-específicas, podendo ter aplicações em diversos tipos de estudos, entre eles, em estudos de biogeografia histórica, análises de zonas de hibridação, estimativas do grau de variabilidade genética, caracterização de estrutura populacional, relações filogenéticas e estudos de conservação genética. Diversas regiões da molécula de DNA mitocondrial estão sendo amplamente utilizadas, como destaque para os genes RNAr 12S, RNAr 16S, Citocromo b, Citocromo Oxidase I e II, ATPase 6 e 8 e a região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*). Esta última vem tendo destaque em estudos populacionais, devido sua alta taxa de mutação, que chega a ser até cem vezes mais rápida quando comparada ao DNA nuclear. Assim, esta é a principal seqüência do DNA mitocondrial utilizada para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações de uma única espécie, inclusive em peixes (Faber & Stepien, 1977; Meyer, 1994; Prioli *et al.*, 2002; Avise, 2004).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar, através do seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial, três populações de *P. galeatus* das bacias dos rios Paraná, São Francisco e Piumhi, sendo esta última, uma região relacionada à transposição entre as outras duas bacias e, através destas informações, analisar os processos de divergência entre essas populações, além de melhor entender os possíveis efeitos desta ação antrópica para a espécie em estudo.

Materiais e Métodos

Amostragem e pontos de coleta

Foram analisados 50 exemplares de *P. galeatus* de três populações distintas em bacias hidrográficas brasileiras: Lagoa da Prata (Estado de Minas Gerais), bacia do rio São Francisco (7 fêmeas e 4 machos); Capitólio (Estado de Minas Gerais), antigo Pantanal do Cururu na bacia do rio Piumhi (9 fêmeas e 12 machos); e Três Lagoas (Estado de Mato Grosso), Reservatório de Jupιά, bacia do rio Paraná (7 fêmeas e 11 machos) (Tab. 1, Fig. 1). Os exemplares da bacia do São Francisco foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 100985), enquanto os exemplares da bacia do Piumhi e Paraná foram depositados na coleção de peixes do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUP 8613, NUP 8614). Para grupo externo, foi realizada a análise de um indivíduo de *Trachelyopterus coriaceus*, o qual foi coletado em lagoas marginais ao córrego do Medo, pertencente à bacia do rio Araguaia, no município de São Miguel do Araguaia (Estado de Goiás, Brasil).

Tabela 1 Dados referentes aos pontos de coleta de *Parauchenipterus galeatus*.

Localidade	Bacia Hidrográfica	Dados de GPS	Número amostral	Catálogo
Lagoa marginal, Lagoa da Prata – MG	São Francisco	19° 56' 15,1" S 45° 32' 13,8" O	4 ♂, 7 ♀	MZUSP 100985
Lagoa dos Tropeiros, Capitólio - MG	Piumhi	20° 33' 99,3" S 46° 03' 21,6" O	12 ♂, 9 ♀	NUP 8613
Reservatório de Jupιά, Três Lagoas - MS	Alto Paraná	20° 44' 60,3" S 51° 39' 10,5" O	11 ♂, 7 ♀	NUP 8614

MZUSP: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo; NUP: Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura – Universidade Estadual de Maringá; MG: Estado de Minas Gerais.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento e alinhamento das sequências

O DNA total foi isolado a partir de tecido do fígado preservado em etanol 100% e extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico através de método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a extração do DNA total foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Após a quantificação, uma alíquota do DNA foi diluída a fim de se obter uma concentração final de 50 ng/μL. Um fragmento do mtDNA (aproximadamente 1200 pb) foi amplificado por PCR utilizando-se os primers FTTF (5' GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA 3' e F12R (5' GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG 3') (Sivasundar *et al.*, 2001). A região controle do mtDNA foi amplificada através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) em 50 μL de reação contendo 5,0 μL de tampão de reação (10x PCR Buffer), 1,25 μL MgCl₂ (50 mM), 8,0 μL dNTPs (1,25 mM), 1,0 μL de cada primer (10 μM), 2 μL DNA (50 ng/μL), 0,3 μL Platinum Taq Polimerase (5U/μL, Invitrogen) e 31,45 μL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (5 min), 36 ciclos de 94°C (30 seg), 48°C (45 seg), 72°C (1 min e 30 seg), seguido por 72°C (7 min). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Purification da Amersham-Pharmacia Biotech. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

O alinhamento das sequências da região *D-loop* do DNA mitocondrial foi realizado com a versão 4.0 do MEGA (Kumar *et al.*, 2001), além de ajustadas manualmente. Posteriormente, estas sequências serão depositadas no banco de dados do

GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>). O melhor método de análise encontrado pelo Modeltest para a região *D-loop* foi o de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), com sítios invariantes (TrN+I). Desta forma, a árvore de distância neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) foi construída por este método. Nessa análise, os valores de suporte foram baseados em 1000 réplicas. O coeficiente gama foi estimado usando a versão 4.0 do PAUP (Swofford, 2002). A análise do parâmetro de índice de fixação molecular (*Fst*) foi realizada com o programa Alerquin versão 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

Resultados

Um fragmento de aproximadamente 1200 pares de bases foi amplificado por PCR em todos os exemplares das três populações de *P. galeatus* (Fig. 2 e 3) e no exemplar de *Trachelyopterus coriaceus*. As sequências foram posteriormente editadas e uma sequência de 847 pares de bases foi utilizada para as análises posteriores. Foram detectados 65 sítios polimórficos entre as três populações (Tab. 2). Foi detectada a existência de 2 haplótipos diferentes entre os 11 exemplares da população da bacia do São Francisco, enquanto que na população da região de transposição apenas 1 haplótipo foi encontrado entre os 21 indivíduos analisados. Entre os 18 indivíduos analisados da população da bacia do rio Paraná foi verificada a existência de 6 diferentes haplótipos (Tab. 2). A análise do parâmetro de índice de fixação molecular (*Fst*) indicou alta estruturação genética entre as três populações de *P. galeatus* com índice de 0.95203. A distância-p entre as três populações analisadas apresentou um grau de divergência genética de 0,2% entre as populações do São Francisco e Piumhi, 4,6% entre Piumhi e Paraná, e 4,8% entre São Francisco e Paraná (Tab. 3). A árvore de distância neighbor-

joining gerada entre essas três populações apresentou valores de *bootstrap* em todos os nós superior a 60% e superior a 85% nos de enraizamento entre as populações (Fig. 4).

Tabela 3 Distância genética entre as três populações de *P. galeatus* analisadas.

Distância-p	São Francisco	Piumhi	Paraná
São Francisco	-	-	-
Piumhi	0,002	-	-
Paraná	0,048	0,046	-

Discussão

Congruência entre os dados citogenéticos e moleculares

Dados cromossômicos anteriormente obtidos através de técnicas de citogenética clássica e molecular mostraram-se importantes para elucidar as relações entre essas populações de *Parauchenipterus galeatus* presentes em bacias hidrográficas distintas e envolvendo uma região de transposição de rio, possibilitando, propor algumas hipóteses quanto à diversificação da população do rio Piumhi, além de discutir sua possível invasão na bacia do Alto Paraná após a construção do reservatório de Itaipu. As diferenças citogenéticas entre as populações estão baseadas nas distintas fórmulas cariotípicas encontradas, que mostraram maior similaridade entre Piumhi e São Francisco, do que em relação à população do rio Paraná. Além disso, foi detectada a presença de cromossomos B na população do São Francisco, não tendo sido encontrados tais cromossomos nos espécimes do rio Piumhi, podendo estes serem considerados importantes marcadores populacionais (Lui *et al.*, in press). Os resultados provenientes do seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial que serão discutidos a seguir completam os dados citogenéticos previamente publicados para tal problemática, confirmando a maior similaridade entre São Francisco e Piumhi, em relação à da bacia do Paraná.

Diversidade genética

No presente trabalho foi detectada a existência de 65 sítios polimórficos em um total de 847 pares de base entre as seqüências de mtDNA (região *D-loop*) das três populações de *P. galeatus*. A região controle do DNA mitocondrial pode ser considerada um bom marcador genético para estudos populacionais, pois apresenta alta taxa mutacional, além do fato de que o DNA mitocondrial possui herança predominantemente materna com ausência e/ou redução de recombinação. Apesar da grande quantidade de sítios polimórficos detectados entre as três populações analisadas, a maioria deles estão relacionados à população do rio Paraná, tendo sido detectado baixo grau de polimorfismo para as populações dos rios São Francisco e Piumhi. Alguns estudos já demonstraram a existência de baixa variabilidade genética quanto ao número de sítios polimórficos da região *D-loop* do mtDNA em outras espécies de peixes, como por exemplo em *Salmo trutta* (Bernatchez *et al.*, 1992; Giuffra *et al.*, 1994; Aurelle & Berrebi, 2001). Vale ressaltar que esta condição pode ser considerada incomum devido a características anteriormente citadas para essa seqüência. Dessa forma, é comumente esperado que o nível de variabilidade genética intra e inter-populacional da região controle do DNA mitocondrial seja mais acentuado, como já observado em vários outros estudos de peixes, tanto marinhos quanto de água doce (Bremer *et al.*, 1996; Dudgeon *et al.*, 2000; Rocha-Olivares *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003; Bay *et al.*, 2004; Batista & Alves-Gomes, 2006).

As populações do Piumhi e do São Francisco apresentaram respectivamente, baixa e ausente diversidade genética, sendo detectados dois haplótipos para o São Francisco e apenas um para o Piumhi. Essas populações foram coletadas em lagoas marginais às suas respectivas bacias, enquanto que a população do Paraná foi coletada

na calha principal deste rio, apresentar uma maior diversidade, com seis haplótipos. A baixa diversidade da população do Piumhi pode ser explicada pela existência do antigo pantanal do Cururu naquela região, que foi drenado para a posterior construção do canal de transposição. Assim, a lagoa na qual foi coletada esta população corresponderia ao que restou deste antigo alagadiço. Um evento de efeito gargalo pode ter ocorrido nesta região, decorrente da drenagem deste pantanal, levando à diminuição do tamanho efetivo da população, o que justificaria a existência de somente um haplótipo. Além do mais, como esta população foi coletada em uma lagoa, o que possibilita propor que a endogamia pode ser um fator culminante para esta baixa diversidade. Na população do São Francisco também foi detectada uma baixa diversidade genética, tanto no número de haplótipos quanto na quantidade de sítios polimórficos. A baixa diversidade detectada nessas populações também pode estar relacionada ao efeito da endogamia. Também não se pode descartar o efeito da deriva genética sob estas populações, visto que estão presentes em lagoas pequenas e, desta forma, estariam mais sujeitas a tal efeito do que se a população fosse grande com ampla distribuição.

Não foi detectado o compartilhamento de haplótipos entre as populações, o que sugere a ausência de fluxo gênico entre elas, que pode ser reforçada pela distância geográfica existente entre os locais de coleta e alto valor obtido para o índice de fixação molecular (F_{st}) para as três populações de *P. galeatus*. Esta possível ausência de fluxo gênico é corroborada pelo fato dessa espécie possuir hábito sedentário/demersal (Froese & Pauly, 2009), diferentemente de outros peixes que podem ser encontrados na bacia do São Francisco, que possuem hábitos migratórios, como *Salminus franciscanus* e *Leporinus elongatus*. Os dados citogenéticos para essas mesmas populações também reforçam tal proposição, uma vez que características cromossômicas específicas de cada uma das populações foram detectadas (Lui *et al.*, in press).

A relação de similaridade encontrada entre as três populações mostra maior proximidade entre São Francisco e Piumhi, conforme visualizado pela distância genética de 0,2% entre elas (Tab. 2). É provável que o tempo divergência entre São Francisco e Piumhi seja menor do que em relação à população do Paraná. Este fato também pode ser explicado pela existência do antigo Pantanal do Cururu, e que deve ter possibilitado que em épocas remotas o fluxo gênico entre as populações dos rios São Francisco e Piumhi tenha se mantido por mais tempo. Dessa forma, o tempo de divergência entre essas duas populações seria mais recente comparativamente à população do rio Paraná. A distância genética obtida entre as populações do São Francisco-Paraná (4,8 %) e Piumhi-Paraná (4,6 %), em contraste com a distância entre São Francisco-Piumhi (0,2 %) reforçam esta hipótese.

Geralmente, altos índices de diversidade genética são indicativos de uma história evolutiva longa e estável, ou podem ser resultado de contato secundário entre diferentes linhagens (Grant & Bowen, 1998). Os dados de *P. galeatus* apresentados neste trabalho possibilitam propor que o processo de diversificação entre essas populações é antigo, principalmente pela ausência de haplótipos compartilhados entre cada um dos pontos de coleta. Entretanto, baixa diversidade pode ser evidência dos chamados gargalos populacionais ou de eventos fundadores recentes (Grant & Bowen, 1998). Isto reforça a proposição feita acima de que a baixa diversidade encontrada na população do São Francisco fosse consequência de um gargalo populacional ocorrido após a drenagem do antigo pantanal existente na região de transposição. Entretanto, a endogamia e da deriva genética também devem ser considerados efeitos importantes para a essa baixa diversidade genética das populações do São Francisco e Piumhi, visto que elas foram coletadas em pequenas lagoas.

É importante ressaltar que mesmo a população presente na região de transposição ter pertencido até a década de 60 a bacia do Alto Paraná, é evidente sua maior similaridade com a população do São Francisco. Antigamente, a bacia do Alto Paraná era constituída por uma série de quedas e cachoeiras que foram sendo inundadas ao longo do tempo devido à construção de hidroelétricas. Essas antigas quedas e cachoeiras possivelmente funcionavam como efetivas barreiras naturais para a espécie em estudo, formando possivelmente, isolados populacionais dentro da bacia do Alto Paraná. O fato da população presente na bacia do rio Paraná (Reservatório de Jupia) ter se mostrado a mais diferente entre as três analisadas pode ser explicado por esse conjunto de barreiras naturais historicamente existentes. Assim, eventos vicariantes ocorridos dentro de um sistema hídrico podem ser em muitos exemplos mais determinantes para a diversificação de populações/espécies do que quando ocorridos entre bacias hidrográficas distintas, como para espécie do presente trabalho.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares e aos técnicos de laboratório Luis Henrique da Silva, Pedro Luis Gallo e Alcídio Culósio Filho pelo auxílio em coletas. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos 07/57302-8 e 08/54620-1) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- Agostinho, AA, Gomes, LC, Suzuki, HI, Júlio Jr., HF (2004) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status (Eds. Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A.). IDRC publications, 380 p.
- Akama, A (2004) Sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 375 p.
- Akama, A., Sarmiento-Soares, L.M. (2007) Família Auchenipteridae. In: Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (eds Buckup, PA, Menezes, NA, Ghazzi, MS) Série Livros 23. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 116-120.
- Aurelle, D, Berrebi, P (2001) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology* 10, 1551-1561.
- Avise, JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Segunda Edição. Sinauer Associates Inc, 684 p.
- Batista JS, Alves-Gomes JA (2006) Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetic Molecular Research* 5, 723-740.
- Bay, LK, Choat, JH, van Herwerden, L, Robertson, DR (2004) High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus*

sordidus): evidence of an unstable evolutionary past? Marine Biology 144, 757–767.

Blanco, DR, Lui, RL, Bertollo, LAC, Diniz, D, Moreira-Filho, O Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). Reviews in Fish Biology and Fisheries (in press).

Bernatchez, L, Guyomard, R, Bonhomme, F (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. Molecular Ecology 1, 161-173.

Bremer, JRA, Naseri, I, Ely, B (1997) Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. Journal of Fish Biology 50, 540–554.

Britski, HA, Sato, Y, Rosa, ABS (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. Câmara do Deputados/CODEVASP, Brasília, 143 p.

Dudgeon, CL, Gust, N, Blair, D (2000) No apparent genetic basis to demographic differences in scarid fishes across continental shelf of the Great Barrier Reef. Marine Biology 137, 1059-1066.

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

Faber, JE, Stepien, CA (1977) The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. In: Molecular Systematics of Fishes. Kocher TD and Stepien, eds) Academic Press, New York, 129-143.

- Ferraris Jr., CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: Check List of Freshwater Fishes of South and Central America. (Eds. Reis, RE, Kullander, SO, Ferraris Jr., CJ) Edipucrs, Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr., CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418, 1-628.
- Froese, R, Pauly, D (2009) FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em 21 de junho.
- Giuffra, E, Bernatchez, L, Gutomard, R (1994) Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of Brown trout northern Italy. Molecular Ecology 3, 161-171.
- Grant, WS, Bowen, BW (1998) Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights from Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. The Journal of Heredity 89, 415-426.
- Kumar, S, Tamura, K, Jakobsen, I, Nei, M (2001) MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, ver. 2.1 Pennsylvania State University, University Park, and Arizona State University, Tempe.
- Lui, RL, Blanco, DR, Margarido, VP, Moreira-Filho, O Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) in Brazil. Biological Journal of the Linnean Society (in press).
- Martins, C, Wasko, AP, Oliveira, C, Foresti, F (2003) Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Parana River basin. Genetics and Molecular Biology 26, 33-38.
- Meyer, A (1994) DNA technology and phylogeny of fish. In: Genetics and Evolution of Aquatic Organisms (ed. Beaumont, AR). Chapman & Hall, London, 219-249.

- Moreira-Filho, O (2006) Uma transposição de rio esquecida. *Revista Universidade Federal de Goiás VIII*, 77–82.
- Moreira-Filho, O, Buckup, PA (2005) A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Parana' River basins. *Neotropical Ichthyology* 3, 449–452.
- Pinna, MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds Malabarba, LR, Reis, RE, Vari, RP, Lucena, ZMS, Lucena, CAS). Edipucrs, Porto Alegre, 279-330.
- Prioli, SMAP, Prioli, AJ, Júlio, Jr., HF, Pavanelli, CS, Oliveira, AV, Carrer, H, Carraro, DM, Prioli, LM (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25, 421-430.
- Rocha-Olivares, A, Garber, NM, Stuck, KC (2000) High genetic diversity, large interoceanic divergence and historical demography of the striped mullet. *Journal of Fish Biology* 57, 1134–1149.
- Saitou, N, Nei, M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Segunda edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato, Y, Godinho, HP (2004) Migratory fishes of the São Francisco river. In: *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, (eds. Carolsfeld, J, Harvey, B, Ross, C, Baer, A). IDRC publications, 380 p.
- Silva, PA, Vieira, GG, Farinasso, M, Carlos, RJ (2003) Determinação da extensão do rio São Francisco. In: *XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (Simpósio*

Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Belo Horizonte, 05-10 de abril, 2003). Belo Horizonte, 393-400.

Sivasundar, A, Bermingham, E, Ortí, G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Biology* 10, 407-417.

Swofford, DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other methods), ver. 4. Software. Sinauer Associates, Sunderland.

Tamura, K, Nei, M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512-526.

Anexos

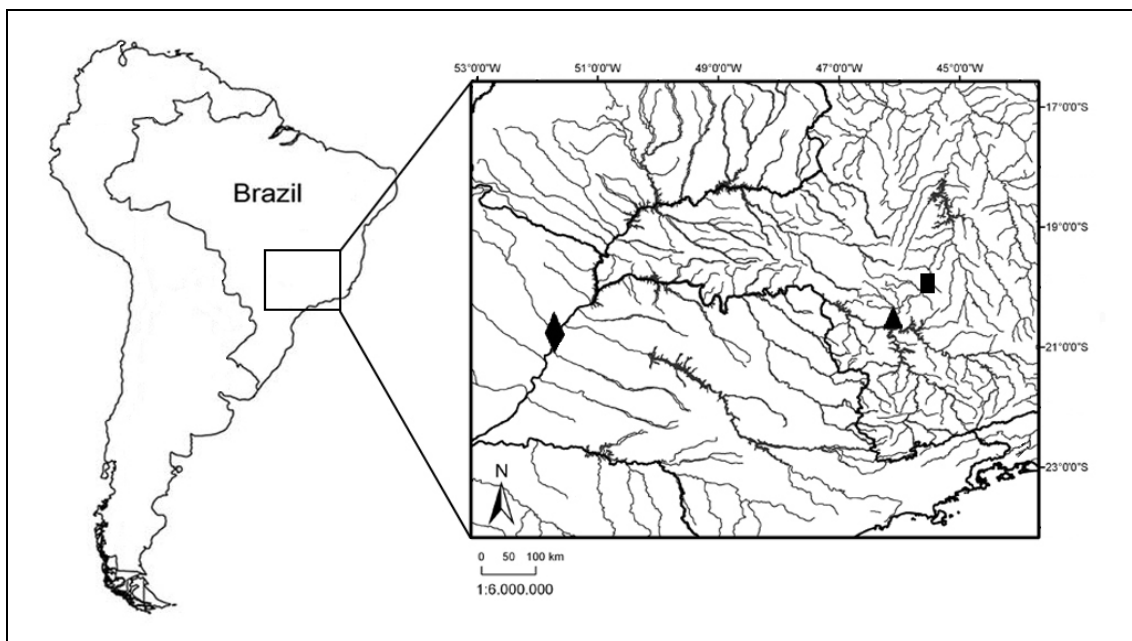


Figura 1 Locais de coleta de *Parauchenipterus galeatus* nas bacias do rio São Francisco (Quadrado), Piumhi (Triângulo) e Paraná (Losango).

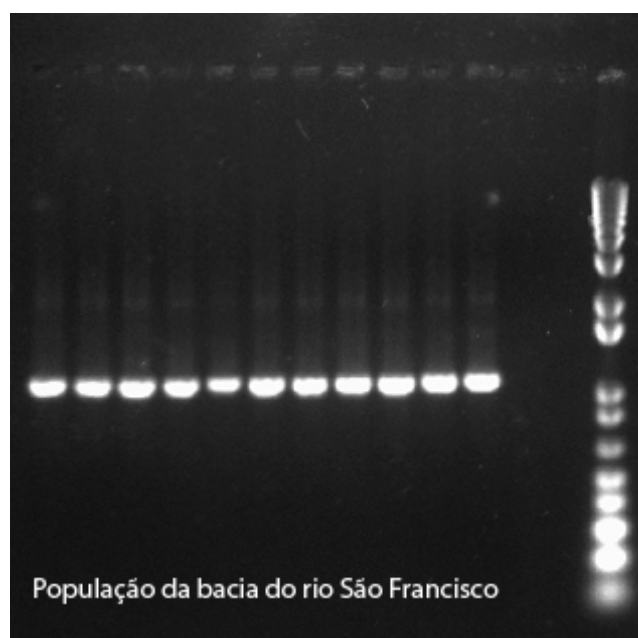


Figura 2 Amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial de todos os indivíduos da população da bacia do rio São Francisco corridos em gel de agarose 1%. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb da Invitrogen.

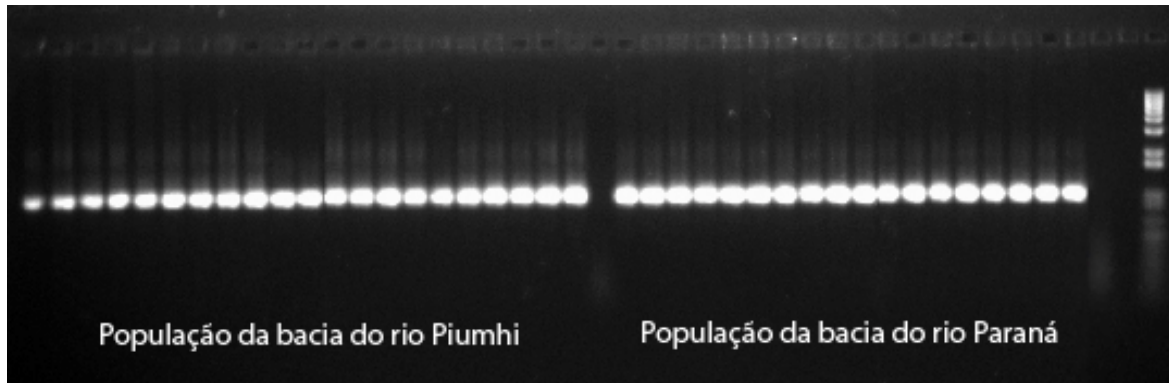


Figura 3 Amplificação da região *D-loop* do DNA mitocondrial de todos os indivíduos das populações da bacia do rio Piumhi e Paraná, corridos em gel de agarose 1%. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb da Invitrogen.

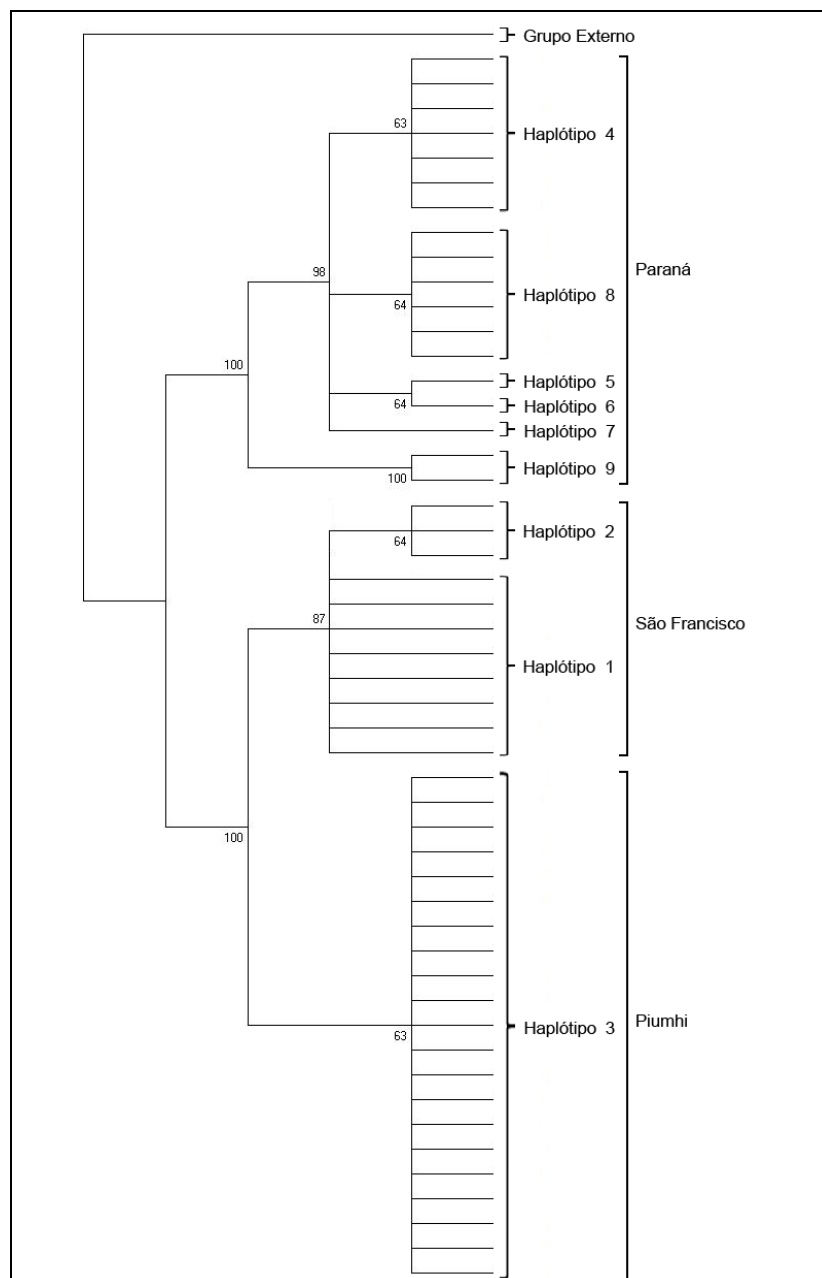


Figura 4 Árvore de distância Neighbor-Joining. Os números presentes nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas..

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Na população do rio São Francisco, município de Lagoa da Prata – MG foi observado pela primeira vez a presença de cromossomos B na família Auchenipetridae;

- Esses cromossomos B são do tipo metacêntrico, pequenos, totalmente heterocromáticos e são encontrados em 70% na população, com variação intra e interindividual de 0 a 2;

- Sua possível origem é isocromossômica. Além disso, as condições ambientais da lagoa onde esta população é encontrada podem ser consideradas ótimas para a existência de cromossomos B. Além disso, o isolamento geográfico parcial da lagoa pode proporcionar uma redução do fluxo gênico com as outras populações da bacia do São Francisco, o que explicaria sua alta frequência populacional;

- Três populações de *P. galeatus* das bacias do rio São Francisco, Piumhi e Paraná foram caracterizadas através de técnicas de citogenética básica e molecular;

- Foram constatadas diferenças entre essas populações principalmente relacionadas às fórmulas cariotípicas e à presença/ausência de cromossomos B. Diferenças nos pares portadores dos sítios de rDNA 5S/18S deve ser uma consequência das distintas fórmulas cariotípicas, uma vez que tais cromossomos parecem ser homeólogos;

- Apesar da população de *P. galeatus* da bacia do rio Piumhi ter apresentado algumas diferenças em relação à população do rio São Francisco, pode-se observar que tais diferenças são menos divergentes quando comparadas à população do rio Paraná. Isto indica que possivelmente as populações do São Francisco e Piumhi divergiram a menos tempo do que em relação à do rio Paraná.

- *Parauchenipterus galeatus* não é considerada uma espécie migradora, portanto de hábito mais sedentário. Esta característica, aliada a eventos como o contexto histórico natural de formação de bacias hidrográficas e acidentes geográficos dentro de uma mesma bacia, que podem conduzir ao isolamento geográfico e posterior redução do fluxo gênico entre populações, facilitando a fixação de rearranjos cromossômicos, o que poderia explicar as divergências populacionais observadas;

- *P. galeatus* foi considerada restrita ao antigo Baixo Paraná (região abaixo de Sete Quedas – PR) até a época em que ocorreu a construção e inundação do reservatório de Itaipu (1982). Entretanto, os dados aqui apresentados para esta espécie, quando comparados aos de uma população do rio Paraná (região de Porto Rico - PR), anteriormente analisada pela citogenética, sugerem que *P. galeatus* possivelmente já ocorria no Alto Paraná;

- A região *D-loop* do DNA mitocondrial é considerada um excelente marcador genético para estudos populacionais. Os dados desta seqüência para as três populações de *P. galeatus* confirmam as proposições feitas com base nos dados citogenéticos. Este fato é confirmado pela árvore de distância neighbor-joining gerada em tal análise com valores de *bootstrap* em todos os nós superior a 60% e superior a 85% nos de enraizamento entre as populações, que mostram uma maior proximidade entre as populações do São Francisco e Piumhi do que em relação à do rio Paraná.

- Uma baixa diversidade genética foi detectada pela análise da região *D-loop* do DNA mitocondrial nas populações do rio São Francisco e Piumhi, diferentemente do que foi encontrado na população do rio Paraná. As duas primeiras populações foram coletadas em lagoas marginais às suas respectivas

bacias, enquanto a terceira foi coletada na margem do rio Paraná. Estas condições podem ser importantes no que se refere às diferenças observadas, vista que fatores como a endogamia e a deriva genética seriam mais determinantes em populações pequenas e isoladas geograficamente, como as do São Francisco e Piumhi deste trabalho.

- Por sua vez, o não compartilhamento de haplótipos entre as três populações sugere forte estruturação populacional e a ausência de fluxo gênico entre elas.

- Dessa forma, dentro da problemática inicialmente proposta, pode-se sugerir que a população de *P. galeatus* da bacia do rio Piumhi já estava presente nesta região antes de ocorrer à transposição do rio Piumhi. Possivelmente, esta população é um resquício da população presente no antigo Pantanal do Cururu, que possibilitaria fluxo gênico com a população do São Francisco, o qual foi dragado para a construção do canal de transposição e da hidroelétrica de FURNAS. Não há dúvidas que a transposição do rio Piumhi causou um grande impacto a diversos organismos desta região, inclusive a ictiofauna. Esta ação antrópica pode ter sido determinante para a diminuição da diversidade genética da população de *P. galeatus* que antigamente habitava o Pantanal do Cururu.

ANEXO I

**First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae,
Parauchenipterus galeatus (Siluriformes) of the São Francisco river basin
(MG, Brazil)**

**Roberto Laridondo Lui, Daniel Rodrigues Blanco, Vladimir Pavan Margarido,
Orlando Moreira Filho**

Publicado: Micron 40 (5-6): 552-559

2009