

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

WELLINGTON ADRIANO MOREIRA PERES

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *ASTYANAX*
(CHARACIFORMES) DA REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI

São Carlos

2009

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

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *ASTYANAX*
(CHARACIFORMES) DA REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Genética e Evolução. (Campo de Pesquisa: Citogenética)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Wellington Adriano Moreira Peres

São Carlos

2009

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

P437ac

Peres, Wellington Adriano Moreira.

Análise citogenética de espécies de Astyanax
(Characiformes) da região de transposição do rio Piumhi /
Wellington Adriano Moreira Peres. -- São Carlos : UFSCar,
2010.
89 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2010.

1. Citogenética de peixes. 2. Transposição de águas -
Piumhi, Rio. 3. São Francisco, Rio. 4. Characidae. 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

“ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE ASTYANAX
(CHARACIFORMES) DA REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI”

Wellington Adriano Moreira Peres

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Submetida à defesa pública no dia 19/06/2009,
tendo sido aprovada.

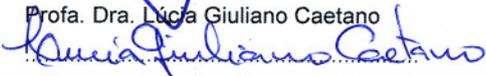
Presidente: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho


Membros: Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo


Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido


Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari


Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

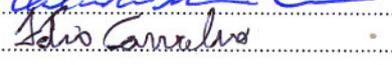
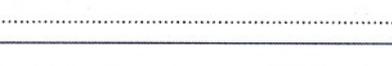

Profa. Dra. Lúcia Giuliano Caetano


Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 227ª Reunião Ordinária da CPG,
em 08/07/2009

Presidente: 

Membros: 



SÃO CARLOS – SP
2009

Orientador

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Dedico esse trabalho a meus pais e irmãos

Agradecimentos

Deixo aqui meus agradecimentos a todos que contribuíram com a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho por ter me confiado uma importante parcela de seu projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Carlos Bertollo, meu co-orientador desde meu mestrado.

Ao Dr. Paulo Andreas Buckup pelas colaborações nos papers.

Aos técnicos Galo e Piau pela colaboração nas coletas e manutenção dos peixes nos aquários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Genética e Evolução.

A FAPESP (Proc. 05/58630-3) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório: Celeste Nakayana, Daniel Kantek, Daniel Blanco, Débora Diniz, Elisangela Bellafronte, Gustavo, Karina Padua, Liano Centofante, Marcelo Belo, Marcelo Vicari, Maressa e Rosângela.

Aos colegas do departamento (Allysson, Ana Karina, Artur, Iderval, Júlia, Luiz Fernando, Marc, Michelle e Thiago) pela companhia e amizade.

Aos amigos do corredor: Fernando Góes, Guilherme Torres e Márcio pelos momentos de descontração.

Aos colegas do IBAMA: Altair, Ana Maria, Áurea Maria, Carlos, Dorival, Edna, Edvaldo, Fábio, Fernando Nunes, Genésio, Gleber, José Roberto, Júlia, Luciano de Brito, Renê Nunes, Rodrigo, Samuel, Thiago.

Ao Gaspar pela amizade e exemplos de honestidade e dedicação em defesa do Meio Ambiente.

A Thais, minha namorada, que sempre me apoiou e acreditou que a distância não seria um empecilho ao nosso relacionamento. Sem você, tudo aqui ficaria muito mais difícil.

E os meus pais e irmãos pela contribuição em todas minhas conquistas.

Eu quase nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.

João Guimarães Rosa

Resumo

A transposição do rio Piumhi ocasionou a introdução de diversas espécies aquáticas na bacia do São Francisco. Espécies como *Leporinus octofasciatus* e *Parodon nasus* que eram restritas a bacia Alto Paraná estão agora presente na bacia do São Francisco. Entretanto, a identificação dos invasores nem sempre pode ser feito através de caracteres morfológicos. Isso fica evidente nos casos onde as espécies invasoras são crípticas de espécies nativas, ou quando ocorre introdução de uma espécie que já possui população residente. Assim, o presente trabalho teve com objetivo caracterizar e mapear a dispersão de algumas espécies invasoras na bacia do São Francisco utilizando marcadores citogenéticos. Foram analisadas populações de *Astyanax altiparanae*, *A. fasciatus* e *A. lacustris*. Foi evidenciada grande similaridade cromossômica entre as espécies crípticas *A. altiparanae* e *A. lacustris* além de polimorfismo cromossômico onde as duas espécies estão em simpatria sugerindo ocorrência de hibridação. Por outro lado, foram verificadas entre as populações de *A. fasciatus* das bacias do Alto Paraná e São Francisco diferenciações quanto a quantidade e distribuição de bandas C, sítios de DNA satélite AS-51, sítios de Ag-NORs, sítios de rDNA 18S e rDNA 5S. Esses marcadores cromossômicos permitiram diferenciar espécimes invasores provenientes da bacia do Alto Paraná na bacia do São Francisco. Não foram encontrados espécimes com características cromossômicas intermediárias entre as populações nativas e introduzidas. Tal fato sugere que as populações do Alto Paraná podem constituir uma espécie distinta.

Palavras chave: Citogenética de peixes; transposição do rio Piumhi; rio São Francisco; Characidae.

Abstract

The transposition of the Piumhi River caused the introduction of many aquatic species in the São Francisco basin. Species previously restricted to the Upper Paraná basin, such as *Leporinus octofasciatus* and *Parodon nasus*, are now present in the São Francisco basin. However, the morphological identification of the invaders is not always possible. This becomes evident in the cases where the invading species are cryptic of native species, and when the newly introduced species already has a resident population. Therefore, the present work had the objective of characterizing and mapping the dispersion of a few invader species in the São Francisco basin using cytogenetic markers. Populations of *Astyanax altiparanae*, *A. fasciatus* and *A. lacustris* were analyzed. Besides a large chromosomal similarity, chromosome polymorphism where the two species were in sympatry was evidenced between the cryptic species *A. altiparanae* and *A. lacustris*, suggesting the occurrence of hybridization. On the other hand, differentiations regarding quantity and distribution of C-bands, AS-51 satellite DNA sites, Ag-NOR sites, and 18S and 5S rDNA sites, were seen between the *A. fasciatus* populations from the Upper Paraná and São Francisco basins. These chromosomal markers differentiated species from the Upper Paraná basin that invaded the São Francisco basin. No specimens with intermediary chromosomal characteristics between the native and introduced populations were found. This fact suggests that the Upper Paraná populations may constitute a distinct species.

Key words: Fish cytogenetics; Piumhi River transposition; São Francisco River; Characidae.

Lista de figuras

FIGURA 1. BACIAS DO SÃO FRANCISCO E DO PARANÁ.....	16
FIGURA 2. DIQUE DE CAPITÓLIO. NA MARGEM ESQUERDA ESTÁ O LAGO DE FURNAS E NA DIREITA O LAGO DO RIO PIUMHI.	19
FIGURA 3. REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI. A: SITUAÇÃO ANTERIOR À CONSTRUÇÃO DA HIDRELÉTRICA DE FURNAS. B: SITUAÇÃO ATUAL. 1 = RIBEIRÃO ÁGUA LIMPA; 2 = RIBEIRÃO SUJO; 3 = RIBEIRÃO DAS ARARAS; 4 = RIBEIRÃO DOS PATOS; 5 = CANAL DE TRANSPOSIÇÃO; 6 = DIQUE DE CAPITÓLIO; 7 = USINA HIDRELÉTRICA DE FURNAS	20
FIGURA 4. ESPÉCIES ANALISADAS. A E B: ESPÉCIME DE <i>A. FASCIATUS</i> COLETADO NA BACIA DO ALTO PARANÁ E DO RIO SÃO FRANCISCO, RESPECTIVAMENTE C E D: ESPÉCIMES DO GRUPO <i>BIMACULATUS</i> COLETADOS NAS BACIAS DO ALTO PARANÁ E DO RIO SÃO FRANCISCO, RESPECTIVAMENTE.	29
FIGURA 5. PONTOS DE COLETA DE <i>A. FASCIATUS</i> (▲) E DO GRUPO “ <i>BIMACULATUS</i> ” (●).	30
FIGURA 6. LOCAIS DE COLETA. A = RIO GRANDE; B = REPRESA DE FURNAS; C= RIO PIUMHI; D = CACHOEIRA NO RIO PIUMHI; E = FOZ DO RIO PIUMHI; F = RIBEIRÃO DAS ARARAS.	31
FIGURA 7. REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI. A: SITUAÇÃO ANTERIOR À CONSTRUÇÃO DA HIDRELÉTRICA DE FURNAS. B: SITUAÇÃO ATUAL. 1 = RIBEIRÃO ÁGUA LIMPA; 2 = RIBEIRÃO SUJO; 3 = RIBEIRÃO DAS ARARAS; 4 = RIBEIRÃO DOS PATOS; 5 = CANAL DE TRANSPOSIÇÃO; 6 = DIQUE DE CAPITÓLIO.	53
FIGURA 8. REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI. OS TRIÂNGULOS REPRESENTAM OS PONTOS DE COLETA. OS CITÓTIPOS DE <i>ASTYANAX FASCIATUS</i> ENTÃO REPRESENTADOS POR A1, A2 E B... ..	54
FIGURA 9. CARIÓTIPOS DE <i>ASTYANAX FASCIATUS</i> ANALISADOS DE FORMA SEQUÊNCIAL POR COLORAÇÃO GIEMSA CONVENCIONAL (AG), BANDAMENTO C (BC) E AG-NORS (AG). A: ESPÉCIMES DO RIO GRANDE; B: DO RIO PIUMHI; C: DO RIO SÃO FRANCISCO.	55
FIGURA 10. CARIÓTIPO DE ESPÉCIME TRIPLÓIDE DE <i>ASTYANAX FASCIATUS</i>	56
FIGURA 11. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE EM CROMOSSOMOS DE <i>ASTYANAX FASCIATUS</i> , COM SONDAS DE rDNA 18S, rDNA 5S E DE DNA REPETITIVO As51. A: ESPÉCIMES DO RIO GRANDE; B: RIO PIUMHI; C: RIO SÃO FRANCISCO.	57
FIGURA 12. REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DO RIO PIUMHI. A: SITUAÇÃO ANTERIOR À CONSTRUÇÃO DA HIDRELÉTRICA DE FURNAS. B: SITUAÇÃO ATUAL. 1 = RIBEIRÃO ÁGUA LIMPA; 2 = RIBEIRÃO SUJO; 3 = RIBEIRÃO DAS ARARAS; 4 = RIBEIRÃO DOS PATOS; 5 = CANAL DE TRANSPOSIÇÃO; 6 =	

DIQUE DE CAPITÓLIO; 7 = USINA HIDRELÉTRICA DE FURNAS; 8 = CACHOEIRA DA USINA; ● = PONTOS DE COLETA.....	73
FIGURA 13. CITÓTIPOS DETECTADOS PARA OS ESPÉCIMES ANALISADOS DE <i>ASTYANAX</i> DO GRUPO “ <i>BIMACULATUS</i> ”. M = CROMOSSOMOS METACÊNTRICOS; SM = SUBMETACÊNTRICOS; ST = SUBTELOCÊNTRICOS; A = ACROCÊNTRICOS. A= ESPÉCIMES DO SÃO FRANCISCO; C= ESPÉCIMES DO ALTO PARANÁ; B, D E E= FORMA ENCONTRADAS SEMENTE NO RIO PIUMHI	74
FIGURA 14. CARIÓTIPOS DE ESPÉCIMES DE <i>ASTYANAX</i> DO GRUPO “ <i>BIMACULATUS</i> ”, ANALISADOS DE FORMA SEQUÊNCIAL POR BANDAMENTO C (BC) E AG-NORS (AG). A = BACIA DO ALTO PARANÁ; B = RIO PIUMHI; C = BACIA DO SÃO FRANCISCO.	75
FIGURA 15. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE COM SONDAS DE rDNA 18S E rDNA 5S EM ESPÉCIMES DE <i>ASTYANAX</i> DO GRUPO “ <i>BIMACULATUS</i> ” DO RIO GRANDE (A), RIO PIUMHI (B) E RIO SÃO FRANCISCO (C).....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	BACIA DO SÃO FRANCISCO.....	13
1.2	BACIA DO PARANÁ	14
1.3	O RESERVATÓRIO DE FURNAS.....	17
1.4	TRANSPOSIÇÃO DE FAUNA	17
1.5	INVASÃO BIOLÓGICA.....	21
1.6	CHARACIDAE.....	22
1.6.1	<i>Astyanax</i>	22
1.7	ESTUDOS CITOGENÉTICOS.....	24
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
3.2	METODOLOGIAS	32
3.2.1	Indução de metáfase	32
3.2.2	Preparação de cromossomos mitóticos.....	32
3.2.3	Bandamento C	33
3.2.4	Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs).....	33
3.2.5	Montagem dos cariótipos.....	33
3.2.6	Hibridação in situ fluorescente (FISH).....	34
4	RESULTADOS.....	36
4.1	IDENTIFICAÇÃO DA INVASÃO E DISPERSÃO DE <i>ASTYANAX FASCIATUS</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DECORRENTE DE TRANSPOSIÇÃO DE RIOS. INVESTIGAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	37
4.2	POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO ESTRUTURAL EM POPULAÇÕES DE <i>ASTYANAX</i> DO GRUPO “ <i>BIMACULATUS</i> ” ASSOCIADO À TRANSPOSIÇÃO DE RIO	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 Introdução

Os represamentos, pelo fato de alterar de maneira profunda e definitiva a dinâmica da água, determinam consideráveis modificações nas comunidades bióticas nas suas áreas de influência, constituindo um dos maiores impactos em ambientes de água doce (DUDGEON, 2000). Para a comunidade de peixes, o resultado é a alteração na abundância das espécies, com a eventual eliminação de algumas delas. Assim, espécies de peixes naturalmente em baixa densidade podem encontrar condições favoráveis e proliferar enquanto outras podem ter sua abundância reduzida.

Além disso, os represamentos podem causar diminuição de habitats, mudanças no ambiente de reprodução, interrupção de rotas de migração, o que pode resultar na perda de biodiversidade (DYNESIUS; NILSSON, 1994; DUDGEON, 2000). Dependendo das características da bacia hidrográfica, o represamento pode, também, eliminar barreiras geográficas à dispersão de determinadas espécies e realizar introduções nos trechos a montante. Por outro lado, pode constituir uma barreira intransponível para populações de peixes localizadas a jusante da barragem. No Brasil a geração de energia elétrica está vinculada principalmente às hidrelétricas devido ao potencial energético de suas principais bacias hidrográficas.

1.1 Bacia do São Francisco

A bacia do São Francisco é a quarta em importância entre as bacias brasileiras, ocupando cerca de 7,4% do território nacional (figura 1). Abrange as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, passando os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (PAIVA, 1982). Ao longo de seu curso, o rio São Francisco estende-se por superfícies de altitude variável (entre 400 e 1000 m), sendo caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cachoeiras.

Esta bacia encontra-se dividida em três regiões: o vale superior, que compreende as regiões que vão desde a cabeceira do rio até a corredeira de Pirapora, o vale médio, que abrange desde a corredeira de Pirapora até a cachoeira Paulo Afonso e o vale inferior, que vai desta cachoeira até a foz. A bacia do São Francisco é habitada por cerca de 160 espécies de peixes, muitas delas caracterizadas pelo endemismo (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Paiva (1983) sugere que, para a distribuição de peixes pelo rio São Francisco, sejam levadas em consideração algumas características, tais como: (1) o São Francisco é um rio perene e que cruza o Brasil de oeste para leste; (2) na região do vale superior, as águas são torrenciais, frias e com pouco material em suspensão; (3) no vale médio, as águas possuem pequena velocidade com temperaturas mais elevadas e com um pouco mais de material orgânico em suspensão, e; (4) no vale inferior, nas proximidades do estuário, as lagoas marginais são verdadeiros criadouros de peixes, com água sedimentada, rica em nutrientes.

1.2 Bacia do Paraná

O rio Paraná, principal formador da bacia do Prata, é o décimo maior do mundo em descarga, e o quarto em área de drenagem, drenando todo o Centro-Sul da América do Sul, até a Serra do Mar, nas proximidades da costa atlântica (IBAMA, 2007). De sua nascente, no planalto central, até a foz, no estuário do rio da Prata, percorre 4.695 km. Em território brasileiro, drena uma área de 891.000 km² (figura 1). Os principais tributários do rio Paraná são o Grande e o Paranaíba (formadores), Tietê, Paranapanema e Iguçu (figura 1). A ictiofauna desse sistema hidrográfico é representada por cerca de 250 espécies, sendo 107 Characiformes, 91 Siluriformes, 20 Perciformes, 3 Rajiformes, 1 Cipriniformes, 1 Pleuronectiformes, 2 Clupeiformes, 5 Cyprinodontiformes e 1 Synbranchiformes (AGOSTINHO; GOMES, 2002).

O rio Grande nasce na serra da Mantiqueira, nas regiões limítrofes dos estados de São Paulo e Minas Gerais, a aproximadamente 1.500 m de altitude (figura 1). Apresentando extensão total de 1.050 km (ZIESLER; ARDIZZONE, 1979), é uma área de drenagem de aproximadamente 143.000 km² (CEMIG; CETEC, 2000), que deságua no rio Paraná, na confluência com o rio Paranaíba, sendo seus maiores tributários os rios Sapucaí e Pardo (ZIESLER; ARDIZZONE, 1979).

Levantamentos da ictiofauna feitos em riachos da bacia do rio Grande evidenciaram a presença de 18 famílias, 44 gêneros e 64 espécies (CASTRO; MENEZES, 1998; CASTRO et al., 2003). Essa ictiofauna vem sofrendo impactos desde os anos de 1960 com a construção de hidrelétricas dentre as quais se destaca a usina de FURNAS.

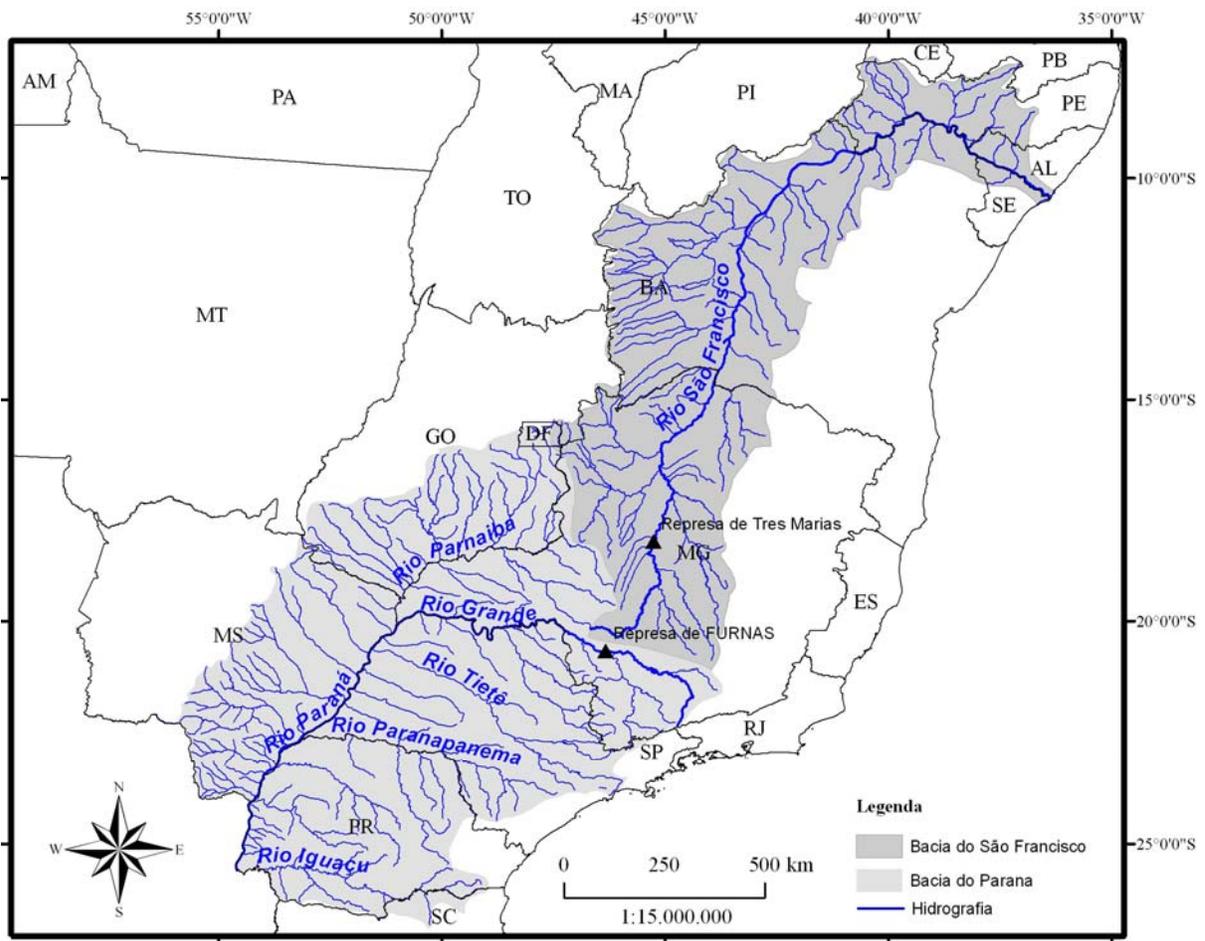


Figura 1. Bacias do São Francisco e do Paraná

1.3 O reservatório de FURNAS

A Usina Hidrelétrica de FURNAS está localizada no curso médio do rio Grande, no trecho denominado "Corredeiras das FURNAS", entre os municípios de São José da Barra e São João Batista da Glória, em Minas Gerais (figura 1) e possui uma potência nominal de 1.216 MW (8 X 152 MW). Sua construção começou em julho de 1958 e em 1963 a primeira unidade entrou em operação. O reservatório, um dos maiores do Brasil, com 1.440 km² e 3.500 km de perímetro, banha 34 municípios de Minas Gerais e é alimentado pelos rios Grande e Sapucaí (FURNAS, 2007). Além dos impactos comumente associados à implantação das grandes represas, a construção de FURNAS trouxe outro ainda pouco conhecido, a transposição de fauna (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005).

1.4 Transposição de fauna

A represa de FUNAS foi construída a menos de 20 km do divisor de águas entre afluentes do rio Grande e do rio São Francisco e com altitude superior aos mesmos. Assim, após o fechamento das comportas de FURNAS as águas do rio Grande escoariam pelo vale do rio Piumhi (afluente do rio Grande) ate atingir à bacia do rio São Francisco. Esse problema foi contornado pela construção de um dique no rio Piumhi em Capitólio, Minas Gerais. Assim, de um lado do dique ficaram as águas do lago de FURNAS e do outro as águas represadas do rio Piumhi (figura 2). Concomitantemente, o rio Piumhi foi transposto para a bacia do rio São Francisco. Para tanto, foi construído um sistema de drenagem que conectou o rio Piumhi ao córrego Água Limpa, que deságua no ribeirão Sujo, afluente da margem direita do rio São Francisco (figura 3b). Desse modo, os peixes da bacia do Alto Paraná que habitam as águas do rio Piumhi passaram a viver juntos com espécies da bacia do rio São Francisco.

O contato dessas duas importantes bacias passou despercebido por mais de 40 anos pela comunidade científica (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005). Assim, espécies tidas como novas na bacia do rio São Francisco podem, na realidade, serem espécies invasoras oriundas da bacia do Alto Paraná.



Figura 2. Dique de Capitólio. Na margem esquerda está o lago de FURNAS e na direita o lago do rio Piumhi.

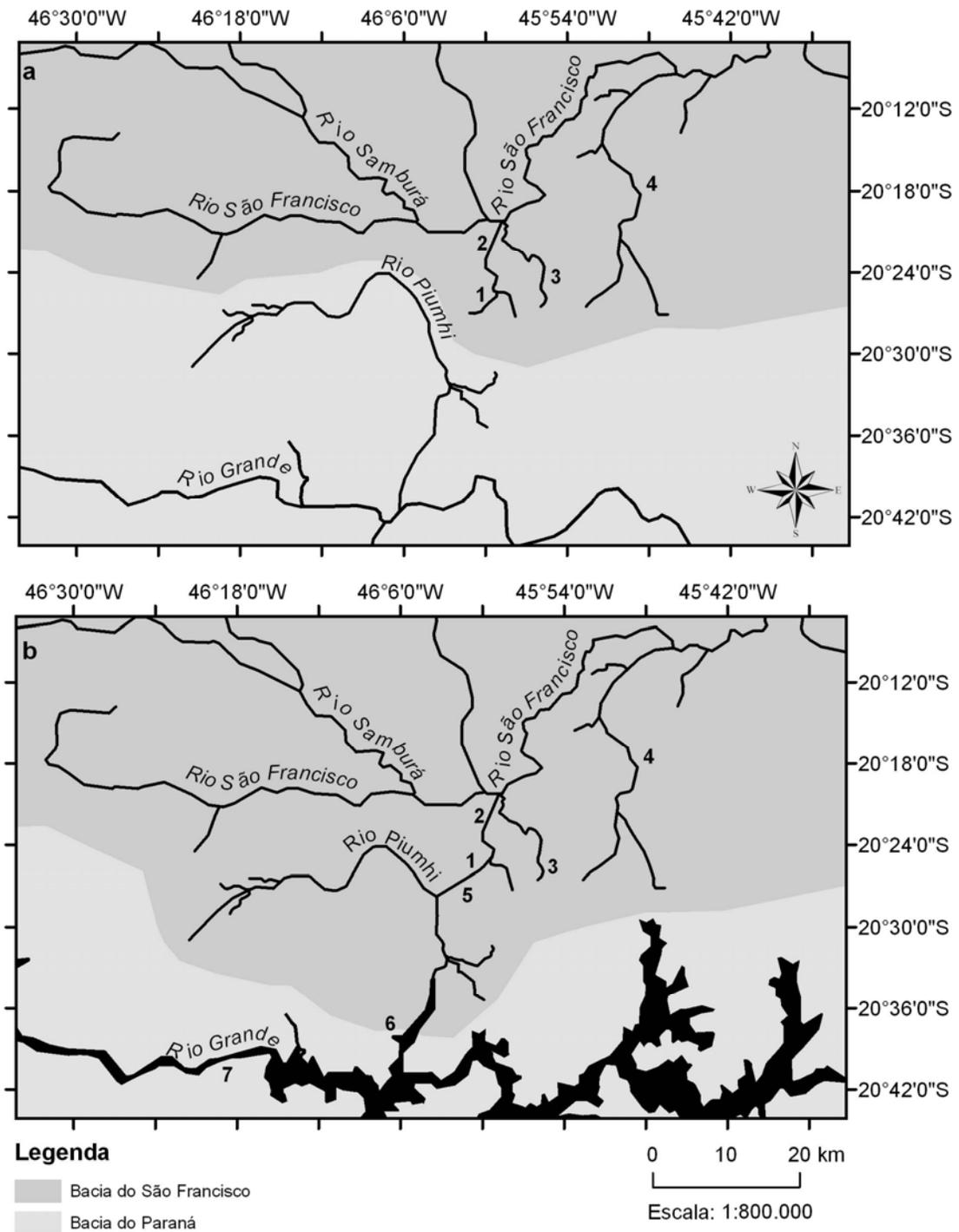


Figura 3. Região de transposição do rio Piumhi. a: Situação anterior à construção da hidrelétrica de FURNAS. b: Situação atual. 1 = ribeirão Água Limpa; 2 = ribeirão Sujo; 3 = ribeirão das Araras; 4 = ribeirão dos Patos; 5 = canal de transposição; 6 = dique de Capitólio; 7 = usina hidrelétrica de Furnas

1.5 Invasão Biológica

As Invasões biológicas vêm aumentando em frequência no cenário mundial e podem produzir danos ecológicos irreparáveis, incluindo a perda de espécies nativas (MACK et al., 2000). Os efeitos ecológicos da introdução de espécies incluem competição, predação das espécies nativas e a introdução de parasitas e doenças (KRUEGER; MAY, 1991; RICKLEFS, 1993). Já os efeitos genéticos podem ser causados pela hibridação de espécies invasoras com espécies nativas, bem como pela diminuição do tamanho efetivo das populações residentes (MILLS et al., 1994). Entre as espécies de peixes, a hibridação não é um evento raro e pode ocorrer até entre gêneros distintos (BRINN; PORTO; FELDBERG, 2004).

Nos rios e lagos, os efeitos de introduções de espécies podem ser mais acentuados em decorrência do isolamento evolutivo entre organismos de diferentes bacias (RICCIARDI; ATKINSON, 2004). No lago Gatún, Panamá, foi introduzido o ciclídeo *Cichla ocellaris* acarretando a extinção de diversas outras espécies de peixes do local (ZARET; PAINE, 1973). O mesmo aconteceu no lago Victoria na África, onde a perca do Nilo, *Lates niloticus*, foi introduzida, a qual contribuiu para a extinção de mais de 200 espécies endêmicas por causa da predação e competição por alimentos (OGUTU-OHWAYO, 1990).

No Brasil a introdução de *Cichla* cf. *monoculus*, *Astronotus ocellatus* e *Pygocentrus nattereri* em lagos da bacia do rio Doce em Minas Gerais, afetou a comunidade nativa, causando o desaparecimento de algumas espécies e a redução na abundância de indivíduos jovens de outras, bem como a redução do peso médio dos indivíduos (SUNAGA; VERANI, 1991; LATINI; PETRERE Jr., 2004). Por outro lado, a introdução de parte da fauna da bacia do Alto Paraná, que habitava o rio Piumhi, para a bacia do rio São Francisco carece de estudos (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005). Essa bacia possui muitas espécies endêmicas, o que pode agravar os efeitos das invasões biológicas.

1.6 Characidae

Characidae é a maior e mais complexa família da ordem Characiformes com cerca de 780 espécies válidas, é também a mais diversificada da região Neotropical (FROESE; PAULY, 2007). Seus representantes são conhecidos popularmente como piranhas, lambaris, tetras, entre muitos outros e possuem hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros), sendo coletados com relativa facilidade nos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados (BRITSKY et al., 1988).

A ampla variedade de formas encontradas nessa família certamente está relacionada à sua condição polifilética. Do mesmo modo, Tetragonopterinae era tida como a mais especiosa entre as subfamílias de Characidae. Entretanto, pela carência de dados que suportariam o seu monofiletismo, foi considerada apenas com o gênero *Tetragonopterus* (LIMA et al., 2003). Os demais gêneros de Tetragonopterinae, entre eles *Astyanax*, foram listados em gêneros “*Incertae Sedis*” em Characidae. No entanto, algumas das subfamílias de Characidae são consideradas monofiléticas por apresentarem certas especializações. Cheirodontinae, por exemplo, apresenta caracteres relacionados à morfologia dentária, à musculatura e ao padrão de colorido na região umeral, que suportam seu monofiletismo (MALABARBA, 1998).

Apesar do grande número de espécies encontradas, muitas delas, antes relatadas como abundantes em certos sistemas, estão cada vez mais raras e podem desaparecer por completo sem ao menos serem estudadas do ponto de vista biológico. Nesse cenário, a destruição de habitat, bem como a introdução de espécies exóticas, figuram como alguns dos principais fatores na diminuição da diversidade dos ambientes aquáticos na região Neotropical (SUNAGA; VERANI, 1991; ORSI; AGOSTINHO, 1999; BOJSEN; BARRIGA, 2002; LATINI; PETRERE JR., 2004).

1.6.1 *Astyanax*

Astyanax é um dos táxons de peixes de água doce mais amplamente distribuído nas Américas. Sua distribuição vai desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (BRITSKI, 1972). Para Eigenmann (1921), esse gênero possui 74 espécies e subespécies.

Já Garutti e Britsky (2000) consideraram aproximadamente 100 espécies nominais. Além do número impreciso é provável que muitas espécies ainda estejam para serem descritas, pois a similaridade morfológica e as definições taxonômicas pouco detalhadas dificultam sua identificação (MELO, 2001).

Um conjunto de pelo menos 15 espécies de *Astyanax* apresenta uma mancha umeral negra, horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos. Esse conjunto de espécies foi definido por Garutti (1998), como grupo *bimaculatus*, por ser o padrão de coloração mais comumente referido para *A. bimaculatus* (LINNAEUS, 1758). No entanto, o nome *A. bimaculatus* (LINNAEUS, 1758) por enquanto só poderá ser aplicado a exemplares do Suriname, provável localidade tipo (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Recentemente, uma espécie desse grupo de *Astyanax* da bacia do Alto Paraná, anteriormente identificada como *A. bimaculatus*, foi renomeada passando a se chamar *A. altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000). A espécie do grupo *bimaculatus* do rio São Francisco, *A. lacustris*, embora tenha o mesmo padrão de colorido de *A. altiparanae* no flanco, dela difere por outros caracteres, tais como alturas aproximadamente iguais das porções acima e abaixo da linha horizontal que passa pela fenda bucal, dentes grandes com penta- e hexacúspides e menor número de dentes pequenos no dentário (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Do mesmo modo, *A. fasciatus* também não representa uma unidade taxonômica (MELO, 2005) e tem sido utilizado para designar um grupo de espécies que compartilham algumas características, tais como corpo alongado, nadadeiras avermelhadas, escamas com reflexo dourado, ocelo umeral difuso e faixa lateral bem nítida (VANZOLINI et al. 1964) sendo encontrado nas principais bacias hidrográficas do Brasil.

1.7 Estudos citogenéticos

Estudos citogenéticos em populações naturais de peixes de água doce Neotropicais têm gerado importantes informações acerca de 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; MOREIRA-FILHO, 1995).

Characidae tem apresentado uma ampla diversidade cariotípica, refletindo sua condição polifilética. Oliveira et al. (1988) relacionaram 199 espécies de Characidae, cujos números haplóides e/ou diplóides já conhecidos evidenciam uma grande diversidade cromossômica, compreendida entre $2n=28$ cromossomos, para uma espécie de *Hemigrammus* (SCHELL, 1973) a $2n=64$ para *Serrasalmus hollandi* (MURAMOTO et al., 1968), com predominância de cariótipos com $2n=48$ e 52 cromossomos. Mesmo os grupos que possuem número diplóide conservado, apresentam diferentes fórmulas cariotípicas, como observado em Cheirodontinae, Bryconinae, *Triportheus*, *Piaractus*, entre outros.

Desse modo, rearranjos Robertsonianos e não-Robertsonianos podem estar igualmente envolvidos nos processos de variação cariotípica presentes em Characidae (GALETTI JR.; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1994). Nos casos em que não há mudanças no número diplóide, inversões pericêntricas podem estar predominando na evolução cromossômica (CESTARI; GALETTI JR., 1992), além das inversões paracêntricas, mais difíceis de serem identificadas pelas técnicas citogenéticas convencionais.

Espécies que possuem uma macroestrutura cariotípica conservada podem ser caracterizadas por técnicas de bandamento cromossômico, bem como pela localização *in situ* de seqüências de DNA. Dentre essas técnicas, destacam-se o bandamento C, para evidenciar as regiões ricas em heterocromatina e a coloração com nitrato de Prata, para evidenciar as regiões organizadoras de nucléolo que estiveram funcionalmente ativas na interfase anterior à mitose (Ag-NORs).

A distribuição de heterocromatina vem se mostrando um ótimo marcador na distinção de espécies e de populações. *Astyanax scabripinnis* foi considerado um complexo de espécies, por, entre outras razões, apresentar quantidades e distribuições de banda C distintas para populações de diferentes bacias hidrográficas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

As Ag-NORs também tem se mostrado útil como marcador nos estudos taxonômicos em peixes. Populações de *A. scabripinnis*, por exemplo, podem ser caracterizadas pelo número de cromossomos portadores de Ag-NORs, os quais podem variar de 1 a 15 (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1991; ROCON-STANGE; ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Do mesmo modo, Serrasalminae pode ser caracterizada pela presença de Ag-NORs múltiplas (ALMEIDA-TOLDEDO; FORESTI, 1985; GALETTI JR.; SILVA; CERMINARO JR., 1985; CENTOFANTE; PORTO; FELDBERG, 2002).

Recentemente, o mapeamento físico de seqüências de DNA pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH) deu um novo impulso à citogenética de peixes. Têm sido descritos principalmente o número e a localização de seqüências de rDNA 18S e 5S, além de seqüências teloméricas e de DNA satélite. A técnica de FISH com sonda de rDNA 18S vem se mostrando uma ferramenta poderosa, em comparação com outras técnicas citogenéticas clássicas, na detecção das NORs ao longo do complemento cromossômico, pois podem identificá-las independente de sua atividade na interfase anterior. Assim, é relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios NORs que os identificados pela técnica de coloração pela Prata, como observado em *Hoplias malabaricus* (BORN; BERTOLLO, 2000), *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003), *Prochilodus lineatus* (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2003).

O número e a localização dos sítios de rDNA 5S têm se mostrado tão varáveis quanto os sítios NORs, principalmente em Characidae (FERRO et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; KAVALCO et al., 2004; MANTOVANI et al., 2005). Por outro lado alguns grupos são mais conservados (MARTINS; GALETTI Jr., 2001a; WASKO et al., 2001). Outra característica relevante entre os Characidae é a ocorrência de cromossomos Bs em algumas espécies (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO-FILHO, 1989, OLIVEIRA et al. 1997;entre outros).

Os estudos citogenéticos vêm se destacando como uma fonte importante de informações para a taxonomia e para o entendimento das relações filogenéticas entre as espécies, pelas caracterizações que permitem ao nível de espécies e/ou populações (OLIVEIRA et al., 1988; AREFJEV 1990; GALETTI JR.; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1994, DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2005). De fato, desde o final dos anos 70, a citogenética vem auxiliando a taxonomia e a identificação de espécies crípticas de peixes (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978, MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; CENTOFANTE et al., 2003). Desse modo, a citogenética constitui uma importante ferramenta na obtenção de caracteres concisos para a identificação de espécies crípticas e populações invasoras.

2 Objetivos

Considerando-se a dificuldade em identificar através da morfologia espécies crípticas do gênero *Astyanax* presentes na região de transposição do rio Piumhi, o presente trabalho teve com objetivo:

1. Caracterizar através do cariótipo populações de *Astyanax* das bacias do Alto Paraná e São Francisco buscando caracteres que estejam relacionados a essas bacias;
2. Mapear a provável dispersão das populações invasoras na bacia do São Francisco;
3. Verificar possíveis cruzamentos entre espécies de *Astyanax* oriundas da bacia do Alto Paraná com espécies nativas do São Francisco na região de transposição.

3 Material e Métodos

3.1 Material biológico

Foram analisados espécimes do complexo *Astyanax fasciatus* (figura 4a; b) e do grupo “*bimaculatus*” (figura 4c; d). Os Exemplares de *A. fasciatus* foram coletados na bacia do São Francisco (figura 5): ribeirão das Araras (figura 6f), ribeirão dos Patos, rio Piumhi e rio São Francisco (figura 6e) e na bacia do Alto Paraná (figura 5): rio Grande a montante (figura 6b) e a jusante da represa de Furnas (figura 6a).

Os espécimes do grupo *bimaculatus* foram coletados a jusante da represa de Furnas no rio Grande (figuras 5 e 6b) e no córrego Monjolinho, município de São Carlos-SP. Na bacia do São Francisco foram coletados no ribeirão dos Patos, no rio Piumhi (figura 6c) e na calha do rio São Francisco, nas proximidades da foz do rio Piumhi (figuras 5 e 6e) e no Município de Três Marias-MG) (figura 5). Diversos pontos foram amostrados no rio Piumhi considerando algumas de suas características. Na sua cabeceira foram amostradas populações separadas por uma cachoeira a qual impede completamente o fluxo gênico a montante (figura 6d).

Após a coleta, os animais foram transportados para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos, onde foram feitas as preparações cromossômicas. Também foram retiradas amostras de tecidos para futuras análises de mtDNA. Em seguida, os peixes foram fixados em formol 10% por 24h, sendo posteriormente guardados em etanol 70%.

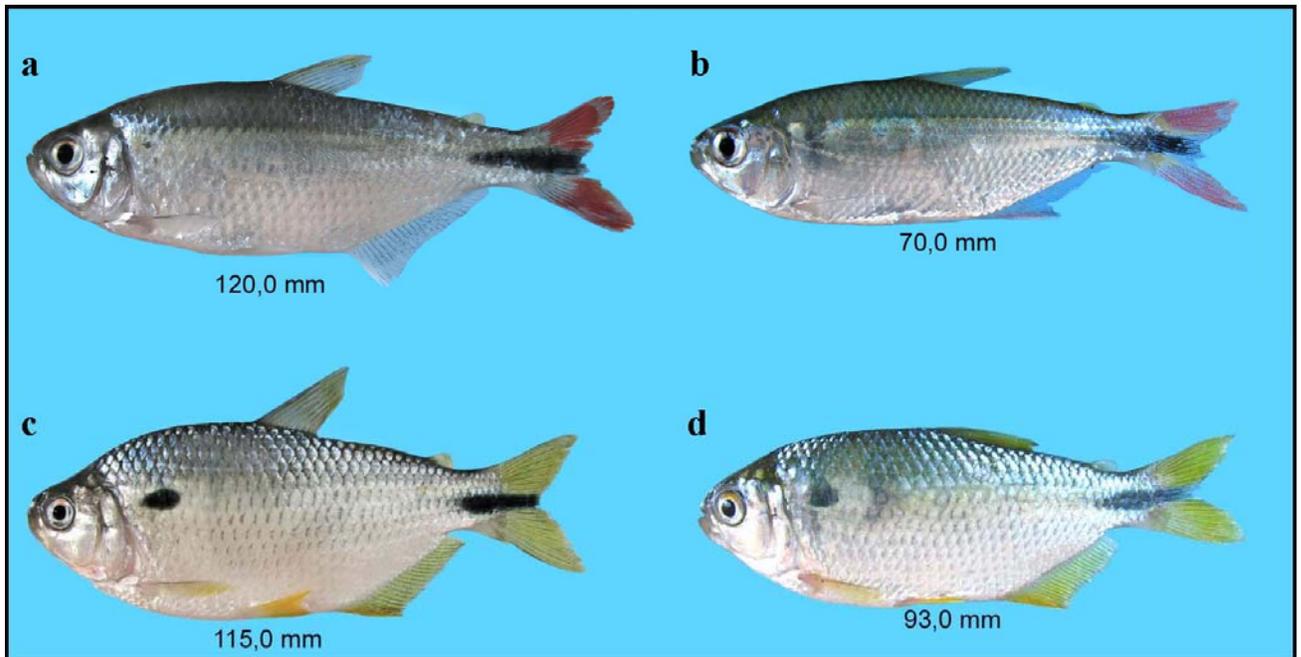


Figura 4. Espécies analisadas. a e b: espécime de *A. fasciatus* coletado na bacia do Alto Paraná e do rio São Francisco, respectivamente c e d: espécimes do grupo *bimaculatus* coletados nas bacias do Alto Paraná e do rio São Francisco, respectivamente.

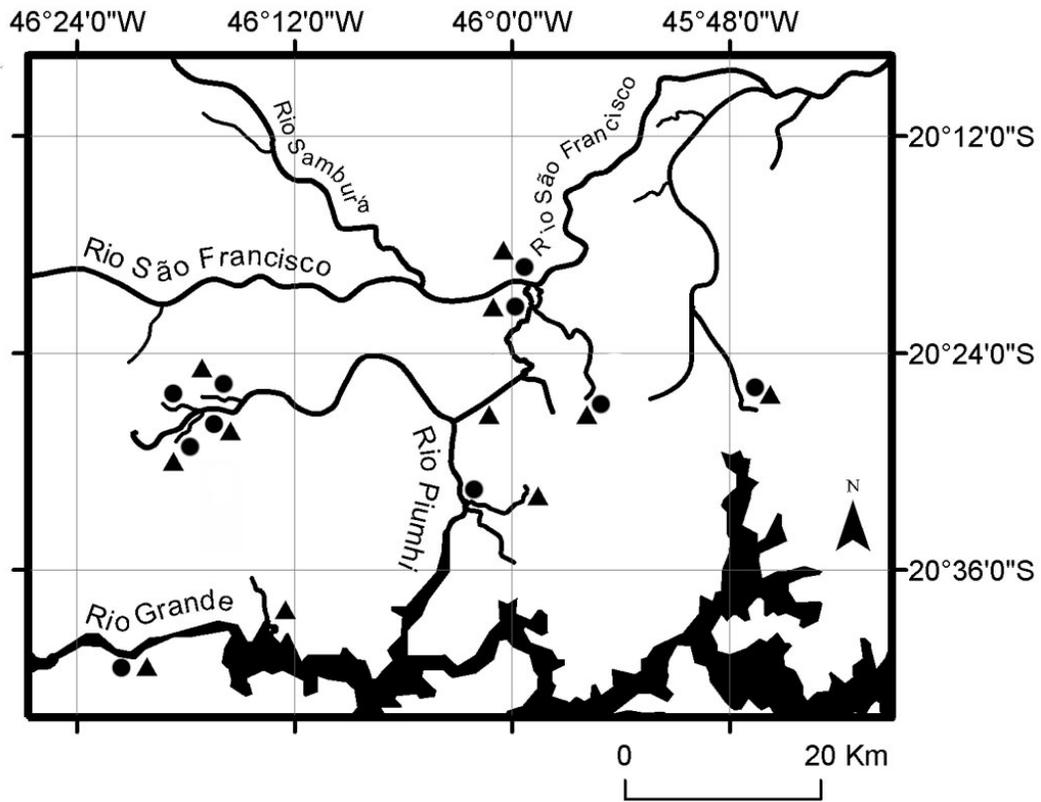


Figura 5. Pontos de coleta de *A. fasciatus* (▲) e do grupo “*bimaculatus*” (●).



Figura 6. Locais de coleta. a = Rio Grande; b = represa de Furnas; c= rio Piumhi; d = cachoeira no rio Piumhi; e = Foz do rio Piumhi; f = ribeirão das Araras.

3.2 Metodologias

3.2.1 *Indução de metáfase*

Foi utilizada a técnica de indução do aumento na frequência mitótica nas células de defesa através da injeção de suspensão de levedura (LEE; ELDER, 1980).

3.2.2 *Preparação de cromossomos mitóticos*

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim por meio da técnica de preparação direta (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978):

1. Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 1mL para cada 100g do animal.
2. Após 30 min sacrificar o animal, retirar o rim e dissociar em solução hipotônica de KCl 0,075mol/L.
3. Incubar a suspensão celular por 20 min em estufa a 37°C.
4. Pingar seis gotas de fixador (metanol/ácido acético-3:1) homogeneizar o material e centrifugar a 900rpm/10 min.
5. Descartar o sobrenadante e acrescentar 10mL de fixador, homogeneizar e centrifugar a 900rpm/10 min.
6. Repetir o passo 5 por mais duas vezes.
7. Após desprezar o sobrenadante da última centrifugação, adicionar 200 a 1000 μ L de fixador homogeneizar e guardar o material a -20°C.

Para a análise cromossômica, três gotas de suspensão celular foram pingadas sobre uma lâmina de vidro e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 7 min.

3.2.3 *Bandamento C*

A identificação das regiões de heterocromatina constitutiva seguiu a metodologia descrita por Sumner (1972):

1. Mergulhar a lâmina em HCl 0,2 mol/L a 42°C por 15 min.
2. Lavar a lâmina e mergulhar em Ba(OH)₂ 5% a 42°C por 30 s a 2 min.
3. Em seguida mergulhar três vezes em HCl 0,2 mol/L.
4. Lavar a lâmina com água destilada e encubar em 2xSSC a 60°C por 30 min.
5. Lavar a lâmina, secar ao ar e corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,8) por 7 min.

3.2.4 *Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)*

A identificação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-NORs) seguiu a técnica descrita por Howell e Black (1980), com algumas adaptações:

1. Mergulhar a lâmina em HCl 0,2 mol/L a 42°C por 3min.
2. Lavar em água corrente e secar ao ar.
3. Pingar na lâmina três gotas de solução aquosa de gelatina (2%) com ácido fórmico (1%).
4. Pingar seis gotas de AgNO₃ (50%), cobrir com uma lamínula e incubar na estufa a 60°C.
5. Quando a lâmina apresentar coloração castanha lavar em água corrente e secar ao ar.

3.2.5 *Montagem dos cariótipos*

Após análise em microscópio óptico as melhores metáfases foram capturadas em campo claro no microscópio Olympus BX50 utilizando o software ImagePro Plus Media Cybernetics. Os cariótipos foram montados com o software Adobe Photoshop 7.0. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos

(a), de acordo com a razão de braços (Levan et al.1964) e arranjados em ordem decrescente em cada grupo cromossômico. Os cariótipos foram dispostos linearmente para permitir a comparação de cromossomos par a par entre os indivíduos.

3.2.6 Híbridação *in situ* fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S foi obtida pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sondas de *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae), obtidas por Hatanaka e Galetti Jr. (2004) e de *Leporinus elongatus* (Teleostei, Anostomidae) por Martins e Galetti JR. (2001b), respectivamente. Além das seqüências de rDNA foi também hibridado a sonda de DNA repetitivo AS51 obtida de *Astyanax scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000). A FISH seguiu a metodologia descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986):

1. As sondas foram marcadas com biotina através de “Nick Translation” com o kit Bionick™ Labeling System, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen™).
2. Desidratar a lâmina em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100%) por 5 min cada. Incubar as lâminas com RNase (40µg/mL em 2xSSC) em câmara úmida a 37°C por 1h.
3. Fixar os cromossomos com formaldeído 1%, PBS 1X, MgCl₂ 50mM por 10 min a temperatura ambiente.
4. Desidratar a lâmina em série alcoólica.
5. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min.
6. Desnaturar a sonda 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.
7. Colocar 50µL da solução de hibridação em cada lâmina e incubar em câmara umedecida com formamida 60% overnight.

8. Lavar com formamida 50% em 2xSSC a 42°C por 20 min e com 0,1xSSC a 60°C por 15 min.
9. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM (No Fat Dry Milk 5%, 4xSSC).
10. Incubar as lâminas com 90µL de FITC 2,5ng/µL em NFDM por 30 min.
11. Incubar as lâminas com 90µL de anti-avidina 1% em NFDM por 30 min.
12. Repetir o passo 10.
13. Repetir o passo 11.
14. Repetir o passo 10.
15. Desidratar em série alcoólica.
16. Montar a lâmina com 25 µL de antifading e 1µL iodeto de propídio (50µg/mL).

4 Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes a artigos científicos:

Capítulo I

Identificação da invasão e dispersão de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) decorrente de transposição de rios. Investigações cromossômicas

Capítulo II

Polimorfismo cromossômico estrutural em populações de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*” associado à transposição de rio

Capítulo I

4.1 Identificação da invasão e dispersão de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) decorrente de transposição de rios. Investigações cromossômicas

Identificação da invasão e dispersão de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) decorrente de transposição de rios. Investigações cromossômicas.

Wellington Adriano Moreira Peres^{1*}, Paulo Andreas Backup²; Daniel Luis Zanella Kantek³; Luiz Antônio Carlos Bertollo⁴ e Orlando Moreira-Filho⁴

¹Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. Rua Barra do Garças, 207, CEP 78640-000, Canarana, MT, Brasil

²Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Quinta da Boa Vista, CEP 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio- Estação Ecológica de Taiamã. Av. Getúlio Vargas s/n, CEP 78200-000, Cáceres, MT, Brasil

⁴Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luís, Km 235, C.P. 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

*Endereço para correspondência: IBAMA, Rua barra do Garças, 207, CEP 78640-000, Canarana, MT, Brasil. E-mail: wellingtonperes@yahoo.com.br

Resumo

Na década de 1960, em decorrência da construção da usina hidrelétrica de FURNAS (Minas Gerais, Brasil), o rio Piumhi teve seu curso alterado, sendo transposto da bacia do Alto Paraná para a bacia do São Francisco, com a conseqüente introdução de espécies de uma bacia para a outra. Foram analisadas as características cromossômicas de diferentes populações de *Astyanax fasciatus*, relacionadas com a área de transposição, utilizando diferentes metodologias de estudo, com o intuito de identificar e mapear a possível dispersão de populações invasoras na bacia do rio São Francisco. Foram identificados marcadores cromossômicos específicos, relacionados com os sítios de heterocromatina, Ag-NORs, rDNA 18S, rDNA 5S e DNA satélite AS-51. Esses marcadores possibilitaram diferenciar as populações do Alto Paraná e do rio Piumhi, daquelas da bacia do rio São Francisco, permitindo inferir sobre a dispersão das populações invasoras e a provável substituição de populações nativas.

Palavras chave: rio Piumhi; Transposição, Citogenética; Espécies invasoras

Introdução

Astyanax fasciatus foi inicialmente descrito como *Chalceus fasciatus* (Cuvier 1819) e, posteriormente, com a criação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard 1854), passou a ter a denominação atual. Entretanto, *A. fasciatus* não representa uma unidade taxonômica (Melo 2005) e tem sido utilizado para designar um grupo de espécies que compartilham algumas características, tais como corpo alongado, nadadeiras avermelhadas, escamas com reflexo dourado, ocelo umeral difuso e faixa lateral bem nítida (VANZOLINI et al., 1964) sendo encontrado em distintas bacias hidrográficas, desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos.

Eigmann (1921) reconheceu as diferenças existentes nesse grupo distinguindo seis subespécies: *A. fasciatus fasciatus*, *A. fasciatus parahybae*, *A. fasciatus heterurus*, *A. fasciatus jequitinhonhae*, *A. fasciatus macrophthalmus* e *A. fasciatus aeneus*. Recentemente, *A. fasciatus parahybae* foi reconhecido como uma espécie distinta, *A. parahybae*, por apresentar um número próprio de raios na nadadeira anal (MELO, 2001), tendo sido sugerido que o nome *A. fasciatus* seja aplicado somente aos exemplares da bacia do rio São Francisco, sua provável localidade tipo (MELO, 2006). De fato, *A. fasciatus* tem sido referido como um complexo de espécies, tanto por apresentar diferenciações morfológicas (GARUTTI; BRITSKI, 2000; MELO, 2001; MELO; BUCKUP, 2006) quanto citogenéticas (JUSTI, 1993; HERAS, 1998; PAZZA et al., 2006; ARTONI et al., 2006) associadas a diferentes bacias hidrográficas, a diferentes tributários de uma mesma bacia ou ate mesmo a formas em simpátricas.

Justi, (1993), analisou citogeneticamente três populações de *A. fasciatus*, uma da bacia do Alto Paraná e duas da bacia do São Francisco, cada uma evidenciando formas cariotípicas (citótipos) particulares, com variações no número diplóide ($2n=46$ e 48), fórmula cariotípica, heterocromatina e Ag-NORs. Por outro lado, exemplares coletados no rio Mogi-Guaçu, bacia do Alto Paraná, apresentaram números diplóides variando de $2n=45$ a $2n=48$ em simpatria e sintopia (DANIEL-SILVA 1996; HERAS 1998; PAZZA et al., 2006).

Durante a década de 1960 o rio Piumhi, afluente do rio Grande, bacia do Alto Paraná, foi transposto para a bacia do São Francisco, em decorrência da construção da usina hidrelétrica de Furnas (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005). No processo de transposição, o rio Piumhi foi

conectado por um canal ao ribeirão Água Limpa que deságua no ribeirão Sujo, afluente da margem direita do rio São Francisco (figura 7). Conseqüentemente, a transposição do rio Piumhi ocasionou a introdução de diversas espécies aquáticas na bacia do rio São Francisco. Assim, espécies como *Leporinus octofasciatus*, que era restrita a bacia alto rio Paraná, encontra-se agora presente na bacia do rio São Francisco (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005). Entretanto, a identificação das espécies invasoras nem sempre pode ser feita por intermédio de dados morfológicos, principalmente quando se trata de espécies que apresentam poucos caracteres concisos para a diferenciação taxonômica. Tal fato fica mais evidente em se tratando de espécies crípticas ou de um complexo de espécies, como *A. fasciatus*.

Nesse cenário, os dados cromossômicos podem constituir uma fonte importante de informações para a identificação das espécies invasoras, ou mesmo para verificar possíveis cruzamentos entre espécimes de populações anteriormente alopátricas. Assim sendo, no presente trabalho, a citogenética foi utilizada como ferramenta para identificar e mapear a provável dispersão de peixes do complexo *A. fasciatus*, provenientes da bacia do alto rio Paraná, para a bacia do rio São Francisco e verificar possíveis híbridagens com a população nativa de *A. fasciatus*.

Material e Métodos

Exemplares de *Astyanax fasciatus* foram coletados na bacia do São Francisco: ribeirão das Araras, ribeirão dos Patos, rio Piumhi e rio São Francisco e na bacia do Alto Paraná: rio Grande a montante e a jusante da represa de Furnas (figura 8) (tabela 1). Os espécimes analisados estão depositados no Museu Nacional/UFRJ (tabela 1)

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim, por preparação direta (BERTOLLO et al., 1978). A heterocromatina constitutiva (bandamento C) e as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) foram evidenciadas segundo Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente. Foram utilizadas análises cromossômicas sequenciais, com coloração Giemsa convencional, bandamento C e Ag-NORs, para uma identificação mais precisa dos cromossomos.

A localização cromossômica dos sítios de rDNA 18S e 5S e do DNA satélite AS-51 foi evidenciada por hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sondas otidas respectivamente de *Prochilodus lineatus* - Teleostei, Prochilodontidae (HATANAKA; GALETTI JR., 2004), *Leporinus elongatus* -Teleostei, Anostomidae (MARTINS; GALETTI JR., 2001) e *Astyanax scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000). O procedimento de FISH seguiu a metodologia básica descrita por Pinkel et al. (1986).

Na organização dos cariótipos, os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a razão de braços (LEVAN et al., 1964) e arranjados em ordem decrescente de tamanho em cada grupo cromossômico.

Resultados

Todas as populações analisadas apresentaram o número diplóide $2n=48$ cromossomos com $8m+20sm+16st+4a$ (figura 9). Entretanto, foi também evidenciado um espécime triplóide, $3n=72$ (figura 10), proveniente do rio Piumhi. Nas populações do rio Grande e rio Piumhi foram observados de 8 a 14 cromossomos sm/st e o primeiro par de acrocêntricos portadores de heterocromatina (figura 9a; b). Entretanto, nos espécimes do rio Grande, foi também observada heterocromatina no braço longo do último par de cromossomos acrocêntricos (figura 9a). Por outro lado, as populações da bacia do São Francisco apresentaram heterocromatina somente no braço longo de um par sm médio (figura 9c). Essas populações apresentaram também um a três cromossomos portadores de sítios de DNA satélite AS-51 (figura 11), divergindo assim das populações coletadas no rio Grande e no rio Piumhi, que apresentaram 12 a 14 sítios cromossômicos (figura 11a; b).

Foram observados sítios múltiplos de Ag-NORs, com ate cinco cromossomos portadores, nas populações do rio Grande e do rio Piumhi (figura 9a; b). Por sua vez, nas populações da bacia do São Francisco foi evidenciado somente um par de Ag-NORs, localizado no braço longo do par submetacêntrico nº 6 (figura 9c). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sonda de rDNA 18S, confirmou o sistema de NORs múltiplas para os exemplares do rio Grande e do rio Piumhi e de NORs simples para os exemplares da bacia do rio São Francisco (figura 11). Nos espécimes do rio Grande foram observados q:o sítios de rDNA 18S, um em cada braço de um cromossomo

submetacêntrico médio, e dois no braço longo de um par submeta/subtelocêntrico (figura 11a). Nos espécimes do rio Piumhi foram observados seis sítios de rDNA 18S, dois nos braços curtos de um par submetacêntrico, dois nos braços longos de outro par submetacêntrico e dois nos braços curtos de um par submeta/subtelocêntrico (figura 11b).

Foram evidenciados quatro sítios de rDNA 5S nas populações do rio Grande e do rio Piumhi, dois na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos médio e dois no braço curto de um par de cromossomos st/a (figura 11a; b). Por outro lado, nos exemplares da bacia do São Francisco foram observados seis sítios de rDNA 5S, dois na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos médios, dois na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos pequenos e dois nos braços curtos de um par st/a (figura 11c).

Discussão

A uniformidade do número diplóide e fórmula cariotípica das populações analisadas no presente trabalho não é a condição mais comum para *Astyanax fasciatus sensu* Eigenamn (1921). Na bacia do alto rio Paraná, por exemplo, ocorrem populações com $2n=48$ e $2n=46$ em alopatria e/ou simpatria (MORELLI et al., 1983; JUSTI 1993; DANIEL-SILVA, 1996; PAZZA et al., 2006; FERNANDES, 2006). Nos locais onde há simpatria também foram observados outros citótipos com $2n=45$ e $2n=47$, sugerindo ocorrência de rearranjos cromossômicos, bem como cruzamentos entre indivíduos com $2n=46$ e $2n=48$ (DANIEL-SILVA, 1996; PAZZA et al., 2006). Na bacia do São Francisco também ocorre populações com $2n=46$ e $2n=48$ cromossomos: espécimes coletados na calha do rio São Francisco, no município de Três Marias (MG), apresentaram cariótipo com $2n=46$ cromossomos; por outro lado, nos espécimes provenientes do córrego da Porta, afluente do rio São Francisco, foi constatado $2n=48$ cromossomos (JUSTI, 1993), assim como nos espécimes analisados no presente trabalho. Desse modo, mesmo na bacia do rio São Francisco, provável localidade tipo *A. fasciatus* (MELO, 2005), parecem estar representadas diferentes espécies desse grupo. Por outro lado, a ocorrência de um espécime triplóide, com $3n=72$ cromossomos, não representa uma novidade entre os peixes, principalmente em *Astyanax*, onde vários casos já foram constatados (MORELLI et al., 1983; FAUAZ et al., 1994; MAISTRO et al., 1994; KANTEK et al., 2007). Possivelmente, a fecundação de um gameta não reduzido por outro gameta normal, como um óvulo ($2n$) por um espermatozóide (n),

seja o evento mais provavelmente implicado na formação desses exemplares (MORELLI et al., 1983; GIULIANO-CAETANO; BERTOLLO, 1990; MAISTRO et al., 1994; KANTEK et al., 2007).

A distribuição de heterocromatina nas populações de *A. fasciatus* da bacia do rio Grande e do rio Piumhi é semelhante ao observado em outras populações da bacia do alto rio Paraná que apresentam cariótipos com 48 cromossomos (PAZZA et al., 2008), diferindo assim do padrão encontrado para as populações da bacia do rio São Francisco. Entretanto, as populações desta bacia, ora analisadas, divergiram quanto ao padrão anteriormente observado nos espécimes do córrego da Porta (JUSTI, 1993), ressaltando a diversidade quanto a este caracter nesta bacia. Igualmente diagnósticos foram os resultados obtidos com os sítios de DNA satélite AS-51, os quais permitiram uma boa diferenciação entre as populações do rio Grande e rio Piumhi, daquelas da bacia do rio São Francisco.

As Ag-NORs, bem como os sítios de rDNA 18S e rDNA 5S, também permitiram, de um modo geral, diferenciar as populações do rio Grande/Piumhi daquelas da bacia do rio São Francisco, embora algumas diferenças tenham sido constatadas entre as duas primeiras.

Considerando as variações citogenéticas descritas anteriormente é possível diferenciar dois citótipos (A e B) de *Astyanax fasciatus* sensu Eigenamn (1921) nas bacias analisadas. O citótipo A é caracterizado por 8 a 14 bandas heterocromáticas no braço longo de cromossomos sm/st e no primeiro par de acrocêntricos, 4 a 6 sítios de rDNA 18S, 4 sítios de rDNA 5S e 10 a 14 sítios de DNA repetitivo AS-51. O citótipo B é caracterizado por uma banda heterocromática no braço curto de um par sm médio, 2 sítios de rDNA 18S, 6 sítios de rDNA 5S e 1 a 3 sítios do DNA repetitivo AS51. O citótipo A ocorre no rio Grande e na área correspondente ao curso original do rio Piumhi. O citótipo B ocorre no rio São Francisco e nos seus afluentes, ribeirão dos Patos e ribeirão das Araras. Ambos os citótipos ocorrem na foz do rio Piumhi, antiga foz do ribeirão Sujo, mas o citótipo A é relativamente raro, sendo representado por apenas um espécime no presente estudo.

A presença do citótipo A onde o rio Piumhi encontra as águas do rio São Francisco sugere que a distribuição desse citótipo se expandiu a partir da bacia do alto rio Paraná para o ribeirão Sujo após a ligação do rio Piumhi ao ribeirão Água Limpa. Antes do represamento e desvio do

rio Piumhi, é provável que a totalidade do ribeirão Sujo, incluindo seu afluente ribeirão Água limpa, era habitada apenas pelo citótipo B o qual é endêmico do rio São Francisco e de seus tributários. Inversamente, a ausência do citótipo B no trecho superior do rio Piumhi sugere que a população do São Francisco não é capaz de sobreviver em áreas onde o citótipo A está presente. Embora a ausência do citótipo B nessa área possa ser devido a fatores ambientais vigentes, é possível que a concorrência entre os citótipos A e B desempenhe um papel significativo. A hipótese de exclusão competitiva é corroborada pela similaridade morfológica entre os exemplares de cada população.

A falta de intermediários, mesmo que as duas formas coexistam na atual foz do Piumhi, sugere que os citótipos A e B podem constituir distintas unidades taxonômicas e corrobora a hipótese de que o *A. fasciatus sensu* Eigenmann (1921), constitui um complexo de espécies (JUSTI, 1993; PAZZA et al., 2006; ARTONI et al., 2006). Assim, espécimes do citótipo A constituem potencialmente uma espécie invasora, que podem, eventualmente, substituir o citótipo B na bacia do São Francisco. As águas do rio Piumhi, antes de cair no rio São Francisco, passam por uma cachoeira e, em seguida, por uma forte corredeira. Essas barreiras não oferecem empecilho ao fluxo à jusante, pois espécies conhecidas da bacia do alto rio Paraná, como *Leporinus octofasciatus* e alguns Prochilodontidae, foram identificadas na foz do rio Piumhi e no rio São Francisco (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005).

Considerando as particularidades quanto à distribuição da heterocromatina e dos sítios de rDNA 18S, o citótipo A pode ser dividido em dois subgrupos que se correlacionam com a distribuição geográfica dos seus portadores. O subgrupo A1 ocorre no rio Grande e possui heterocromatina no braço longo do último par de cromossomos acrocêntricos e 4 sítios de rDNA 18S. O subgrupo A2 ocorre no rio Piumhi e é caracterizado pela ausência de heterocromatina no braço longo do último par de cromossomos acrocêntricos e por 6 sítios de rDNA 18S. O subgrupo A2 foi provavelmente a forma dominante no rio Piumhi, mesmo antes da transposição para a bacia do São Francisco, pois é o único subgrupo presente nas cabeceiras. Essas cabeceiras são isoladas a partir do curso inferior do rio Piumhi por uma cachoeira que representa uma barreira intransponível a montante aos peixes migratórios.

As características da população de *A. fasciatus* sensu Eigenmann (1921) que habitavam o Rio Grande antes da construção da usina hidroelétrica Furnas é incerto, pois as condições do rio foram inteiramente substituídas por um grande reservatório artificial. Se a população que se encontra atualmente presente no reservatório de Furnas é descendente direta dos peixes que ocorreram nas águas do Rio Grande, no seu estado primitivo, podemos supor que os subgrupos A1 e A2 podem ter se originado através de processos de vicariancia associados ao isolamento entre as águas do rio Piumhi e do rio Grande. Esse isolamento pode ter ocorrido em função da estrutura em cânion do vale do rio Grande. Alguns dos afluentes do Rio Grande foram isolados a partir do curso principal por íngremes cachoeiras, algumas das quais ainda são visíveis a oeste, acima do reservatório artificial, ao longo da rodovia que liga Furnas ao dique de Capitólio.

Por outro lado, o rio Piumhi, antes da construção da barragem Furnas, corria em uma área pantanosa habitada por uma fauna diversificada incluindo espécies típicas de pântano, como jacarés e mamíferos aquáticos. O sistema de canais artificiais profundos que foram construídos durante a transposição do rio Piumhi também foi utilizado para drenar a área pantanosa do médio vale do rio Piumhi. Assim, é plausível que o subgrupo A2 foi inicialmente associado ao ambiente pantanoso do rio Piumhi, e foi originalmente isolado do subgrupo A1 pelas íngremes paredes do cânion do rio Grande. Com o enchimento do reservatório Furnas essas paredes foram submersas, e as barreiras biogeográficas originais foram substituídas pelo dique de Capitólio, que é atualmente responsável pela manutenção do isolamento entre os subgrupos A1 e A2.

Estudos sobre a introdução ou troca de espécies entre bacias e suas conseqüências podem ser dificultados pela identificação das espécies invasoras, principalmente quando se trata de espécies crípticas ou pertencentes a um complexo de espécies. Os dados ora apresentados mostram que a Citogenética pode ser uma ferramenta valiosa nesses casos, possibilitando o rastreamento e a distribuição geográfica de espécies invasoras, com a possível extensão dessas análises quanto a prováveis hibridações com as populações residentes e o destino dessas populações ao longo do tempo.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Proc. 05/58630-3), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Referências Bibliográficas

ARTONI, R. F. et al. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei: Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotrop Ichthyol**, v. 4, p. 197-202, 2006.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 1, p. 103-120, 1978.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. **Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1996. 176p. Dissertação de Mestrado-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool**, V 43, p. 209-310, 1921.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B-chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Braz J Genet**, V. 17, p. 157-163, 1994.

FERNANDES C, A. **Estudos citogenéticos em três espécies do gênero *Astyanax*, com ênfase no DNA ribossomal**. 2006. 66p. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. 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. **Comum Mus Cienc Tecnol PUCRS Ser Zool**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GUILIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic variability in *Hoplerytinus unitaebiatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II Occurrence of Natural Triploidy. **Braz J Genet**, v. 13, p. 231-237, 1990.

HATANAKA, T. E.; GALETTI JR., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae), **Genetica**, v.122, p. 239 – 244, 2004.

HERAS, M.P. **Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de alguns rios do Brasil**. 1998. 86p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. 1993. 83p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.

KANTEK, D. L. Z et al. Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu River Basin. **Braz Arch Biol Technol**, v. 50, p. 67-74, 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, K. E.; SANDBERG, H. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

MAISTRO, E. L. et al. Natural Triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and Simultaneous occurrence of Macro B-Chromosomes. **Caryologia**, v. 47, p. 233-239, 1994.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910, 2001.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arq Mus Nac Rio de Janeiro**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MELO, F. A. G. **Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. 2005. 269p. Tese de doutorado - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MELO, F. A. G.; BUCKUP, P. A. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel (1870), from Southern Brazil (Teleostei, Characiformes). **Neotrop Ichthyol**, v. 4, p. 45-52, 2006.

MESTRINER, C. A et al. Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* in an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, p. 445-448, 2005.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenet Genome Res**, v. 112, p. 313-319, 2006.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 2 - Chromosomal location of a satellite DNA. **Cytogenet Genome Res**, v. 122, p. 61-66, 2008.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 2934-2938, 1996.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

Tabela 1. Localidade, coordenadas geográficas e número de indivíduos analisados por sexo

Localidade	Coordenadas geográficas	M	F	I	Total	Voucher MNRJ
Rio Piumhi	20° 27' 11"S; 46° 17' 00"W	0	5	0	5	32797
Foz do rio Piumhi e rio São Francisco	20° 20' 31"S; 45° 59' 03"W	6	7	36	49	32751 32754 32777
Ribeirão das Araras	20° 26' 16"S; 45° 55' 40"W	8	6	5	19	32798 32772
Ribeirão das Almas	20° 26' 33"S; 46° 15' 58"W	1	0	0	1	32733
Rio Piumhi	20° 31' 55"S; 46° 02' 42"W	5	27	3	35	32796 32780 32790 32752
Ribeirão dos Patos	20° 26' 11"S; 45° 47' 31"W	7	12	2	21	32780
Ribeirão Três Bueiros	20° 34' 58"S; 46° 00' 15"W	3	4	0	7	32754
Rio Grande	20° 40' 43"S; 46° 20' 26"W	0	5	0	5	32765
Rio Grande	20° 39' 17"S; 46° 12' 59"W	4	5	0	9	32776

MNRJ = Museu Nacional do Rio de Janeiro; M = macho; F = fêmea; I = sexo indeterminado.

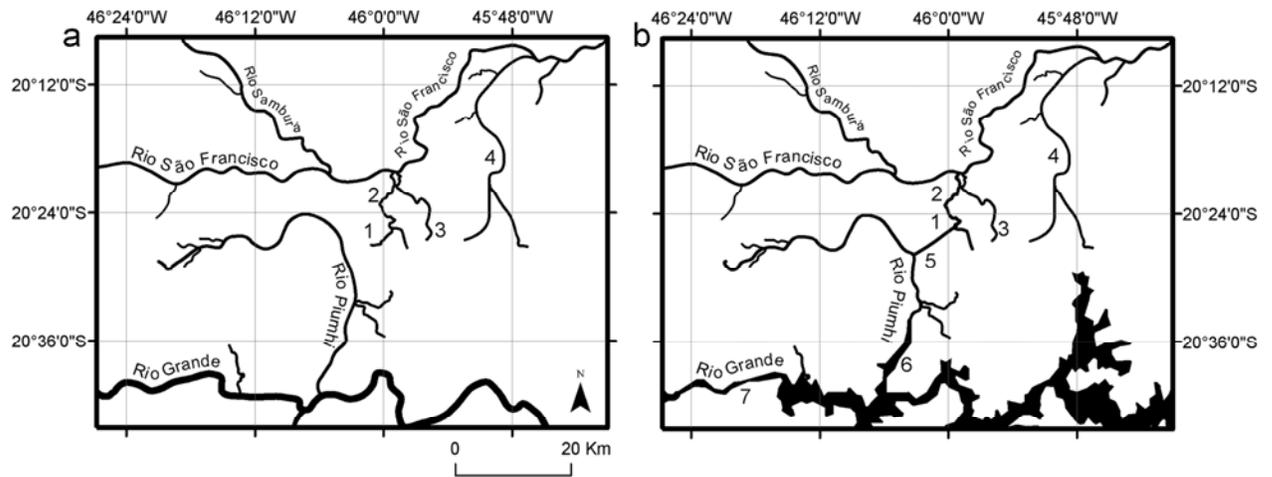


Figura 7. Região de transposição do rio Piumhi. a: Situação anterior à construção da hidrelétrica de FURNAS. b: Situação atual. 1 = ribeirão Água Limpa; 2 = ribeirão Sujo; 3 = ribeirão das Araras; 4 = ribeirão dos Patos; 5 = canal de transposição; 6 = dique de Capitólio.

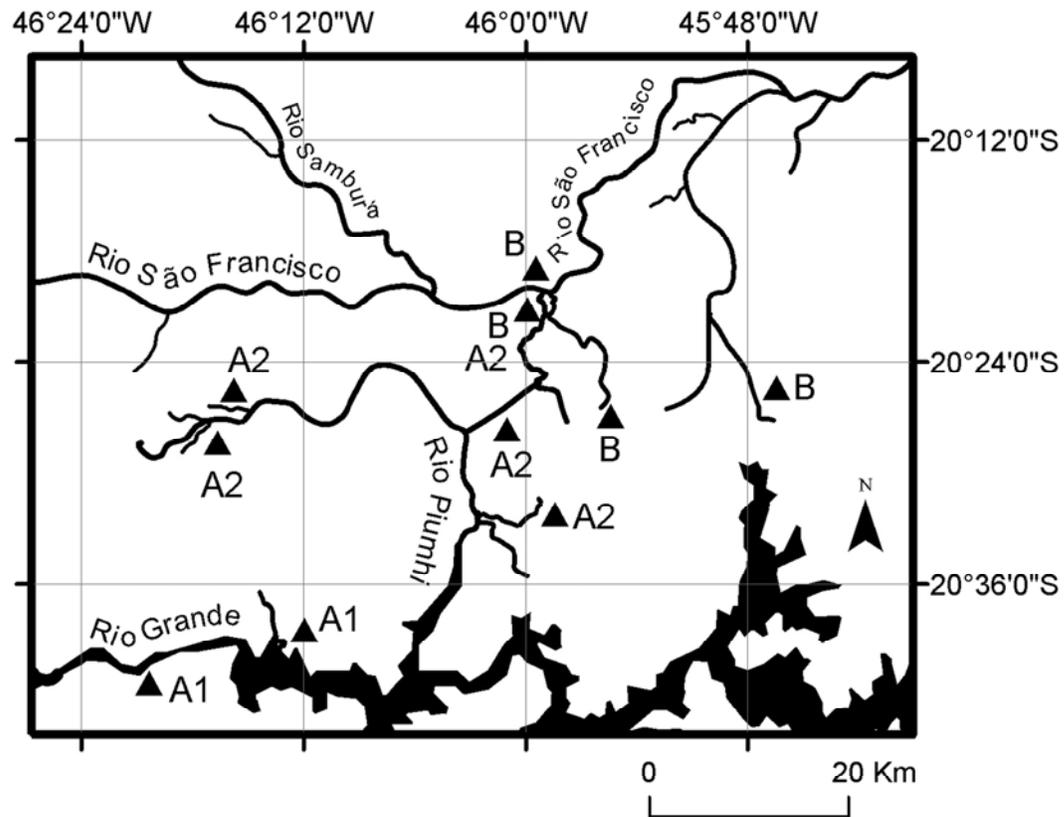


Figura 8. Região de transposição do rio Piumhi. Os triângulos representam os pontos de coleta. Os citótipos de *Astyanax fasciatus* então representados por A1, A2 e B.

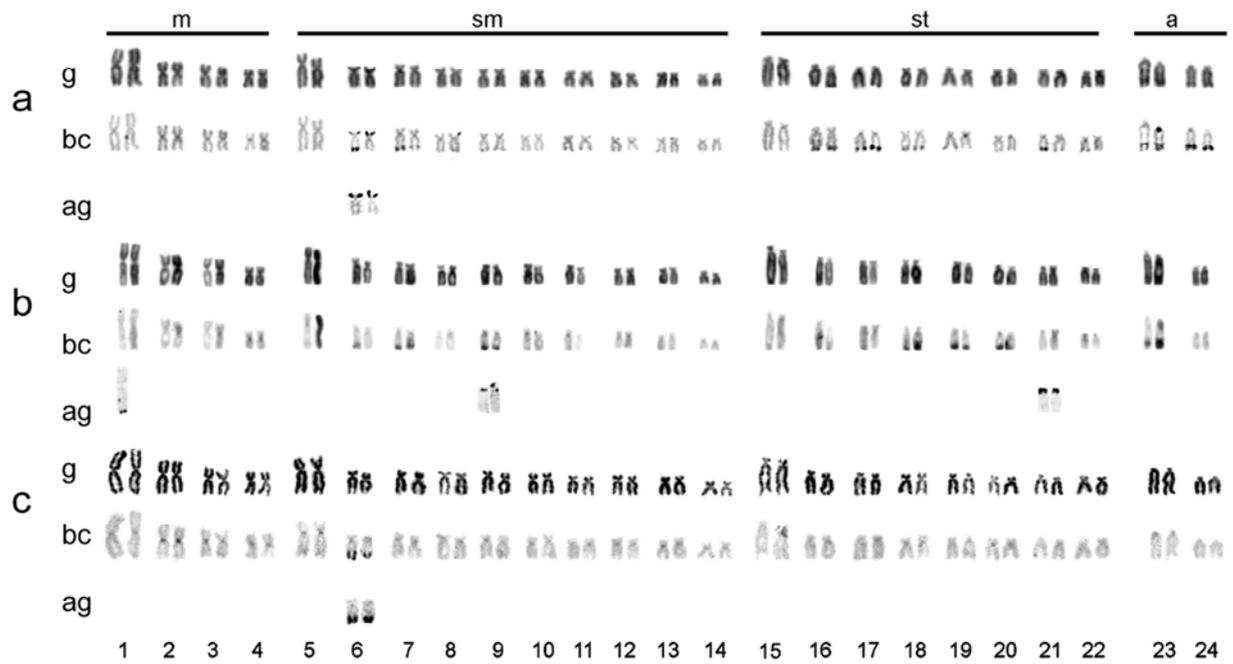


Figura 9. Cariótipos de *Astyanax fasciatus* analisados de forma seqüencial por coloração Giemsa convencional (g), Bandamento C (bc) e Ag-NORs (ag). a: espécimes do rio Grande; b: do rio Piumhi; c: do rio São Francisco.

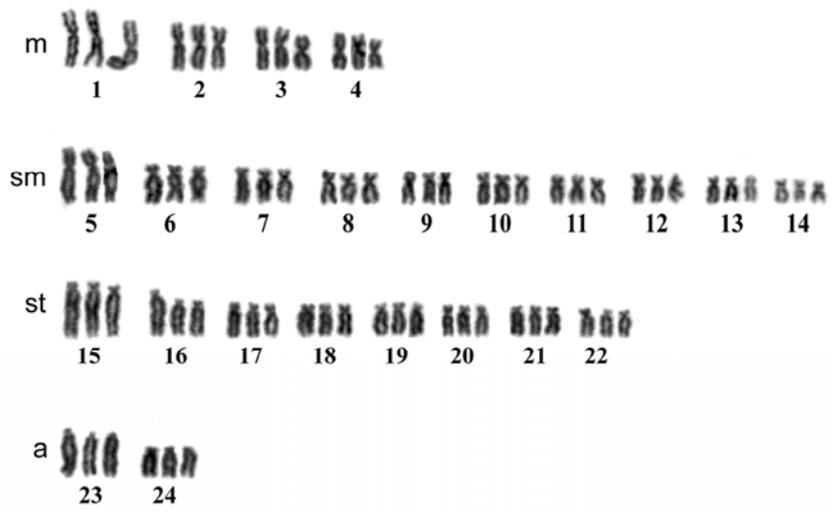


Figura 10. Cariótipo de espécime triplóide de *Astyanax fasciatus*.

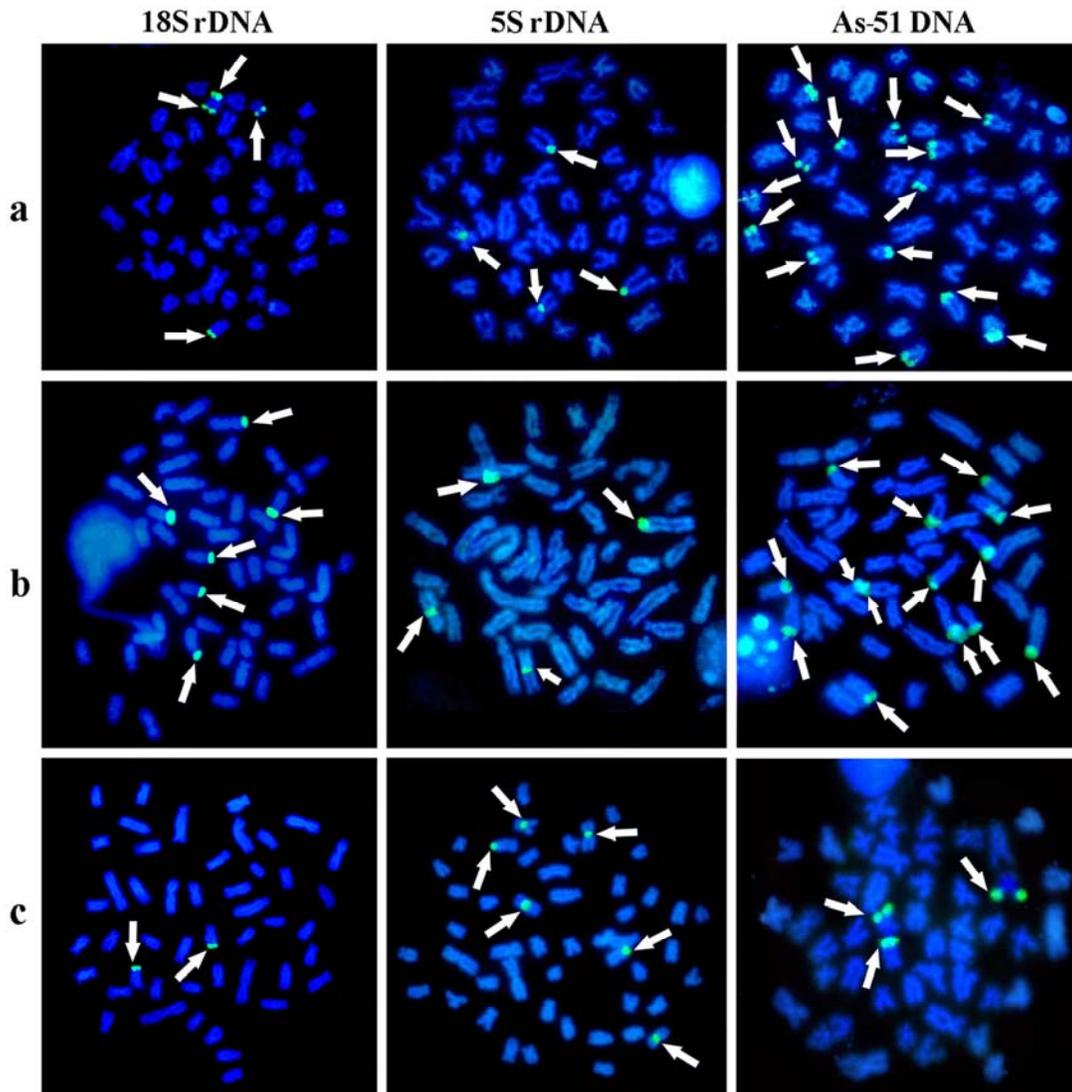


Figura 11. Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos de *Astyanax fasciatus*, com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e de DNA repetitivo As51. a: espécimes do rio Grande; b: rio Piumhi; c: rio São Francisco.

Capítulo II

4.2 Polimorfismo cromossômico estrutural em populações de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*” associado à transposição de rio

Polimorfismo cromossômico estrutural em populações de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*” associado à transposição de rio

Wellington Adriano Moreira Peres^{1*}, Paulo Andreas Buckup²; Daniel Luis Zanella Kantek³; Luiz Antônio Carlos Bertollo⁴ e Orlando Moreira-Filho⁴

¹Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA. Rua Barra do Garças, 207, CEP 78640-000, Canarana, MT, Brasil

²Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Quinta da Boa Vista, CEP 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio- Estação Ecológica de Taiamã. Av. Getúlio Vargas s/n, CEP 78200-000, Cáceres, MT, Brasil

⁴Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luís, Km 235, C.P. 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

*Endereço para correspondência: IBAMA, Rua barra do Garças, 207, CEP 78640-000, Canarana, MT, Brasil. E-mail: wellingtonperes@yahoo.com.br

Palavras chave: *A. altiparanae*, *A. lacustris*, rio Piumhi, Polimorfismo cromossômico

Resumo

Pelo menos 15 espécies de *Astyanax* compõem o grupo denominado *bimaculatus* por compartilharem um mesmo padrão de coloração. Recentemente, as populações de *A. bimaculatus* que habitam as bacias hidrográficas do Alto Paraná e do São Francisco receberam os nomes *A. altiparanae* e *A. lacustris*, respectivamente. No início da década de 1960 o rio Piumhi, um afluente do rio Grande, bacia do Alto Paraná, foi transposto para a bacia do São Francisco, em decorrência da construção da usina hidrelétrica de Furnas. Assim, toda a fauna aquática que habitava o rio Piumhi foi introduzida na bacia do São Francisco. Nesse contexto, utilizamos a citogenética como ferramenta para analisar populações do grupo *bimaculatus* nas bacias do Alto Paraná e do São Francisco, incluindo o rio Piumhi, e verificar a provável dispersão de populações invasoras na bacia do São Francisco. Todas as populações analisadas apresentaram $2n=50$ cromossomos. Entretanto, foram observadas diferenciações quanto às fórmulas cariotípicas. As populações da bacia do São Francisco apresentaram $8m+32sm+2st+8a$, constituindo o citótipo A, diferentemente das populações da bacia do Alto Paraná que apresentaram $8m+34sm+2st+6a$, constituindo o citótipo C. Por outro lado, esses dois citótipos foram observados em simpatria no rio Piumhi, juntamente com outros 3 citótipos denominados de B, D e E os quais possivelmente representam formas intermediárias. Tal fato sugere que as populações do Alto Paraná estão estreitamente relacionadas às populações do São Francisco e que o polimorfismo encontrado no rio Piumhi pode ter origem na hibridação entre essas populações.

Introdução

Astyanax Baird e Girard (1854) é um dos gêneros mais especiosos de Characidae, estendendo-se desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos, em diversos ambientes aquáticos. Em 2003, foram listadas 86 espécies válidas de *Astyanax* (LIMA et al., 2003), enquanto que atualmente mais de uma centena de espécies já se encontram descritas (FROESE; PAULY, 2008). Provavelmente este número de espécies seja

ainda aumentado, uma vez que a similaridade morfológica e as definições taxonômicas pouco detalhadas dificultam uma identificação precisa nesse grupo (MELO, 2001).

A. bimaculatus (LINNAEUS, 1758), por exemplo, representa um complexo de pelo menos 15 espécies caracterizadas por uma mancha umeral negra, horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Recentemente, as populações de *A. bimaculatus* das bacias do Alto Paraná e do São Francisco passaram a ser referidas como *A. altiparanae* e *A. lacustris* (LÜTKEN, 1875), respectivamente (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

Segundo Garutti e Britski (2000), embora *A. lacustris* tenha o mesmo padrão de colorido de *A. altiparanae*, difere desta última espécie por apresentar alturas aproximadamente iguais das porções acima e abaixo da linha horizontal que passa pela fenda bucal, dentes grandes penta-hexacuspídeos e menor número de dentes pequenos no dentário.

As semelhanças entre essas duas espécies não se limitam apenas a aspectos morfológicos. Ambas possuem o mesmo número cromossômico, $2n=50$ (MORELLI et al., 1983; PAGANELLI, 1990; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007) e heterocromatina pericentromérica na maioria dos cromossomos (PAGANELLI, 1990; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007). *A. altiparanae* e *A. lacustris* também compartilham o número e a localização dos sítios de rDNA 5S (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006). Por outro lado, os sítios de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) podem variar, com o predomínio de sítios múltiplos em *A. altiparanae* e simples em *A. lacustris* (PAGANELLI, 1990; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; ALBERDI; FENOCCHIO, 1997; PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006).

No início da década de 1960 foi construída a usina hidrelétrica de Furnas no rio Grande, bacia do Alto Paraná, no Estado de Minas Gerais (Brasil). Para limitar a área que seria alagada foi construído um dique (dique de Capitólio) no rio Piumhi, afluente do rio

Grande. Assim, de um lado do dique ficaram as águas da usina de Furnas e, do outro lado, as águas represadas do rio Piumhi, o qual foi transposto para a bacia do São Francisco através de um canal que o ligou ao ribeirão Água Limpa (figura 12) (MOREIRA-FILHO; BUCKUP, 2005). Assim, toda a fauna aquática do rio Piumhi (bacia do Alto Paraná) foi conseqüentemente, transposta para a bacia do São Francisco.

Tal cenário criou a oportunidade de analisar o comportamento de *A. altiparanae* e *A. lacustris*, anteriormente separadas nas duas bacias hidrográficas em questão (Alto Paraná e São Francisco). Para tanto, utilizamos a citogenética como ferramenta para verificar a possível ocorrência de hibridação entre *A. altiparanae* e *A. lacustris* na região de transposição do rio Piumhi e mapear a provável dispersão de *A. altiparanae* como espécie invasora na bacia do São Francisco.

Material e Métodos

Os espécimes da bacia do Alto Paraná foram coletados à jusante da represa de Furnas, no rio Grande (MG) (figura 12b) e no córrego Monjolinho (tabela 2), município de São Carlos-SP. Os espécimes da bacia do São Francisco foram coletados no ribeirão dos Patos, ribeirão das Araras; rio Piumhi e no rio São Francisco em dois locais: nas proximidades da foz do rio Piumhi (figura 13b) e no Município de Três Marias (MG) (tabela 2). Diversos pontos foram amostrados no rio Piumhi, considerando algumas de suas características. Assim, na sua cabeceira foram amostradas populações separadas por uma cachoeira que devido sua altura e declividade impede completamente o fluxo gênico à montante (figura 12b).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim pelo método convencional de air-drying (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978). A análise da heterocromatina constitutiva (bandamento C) e das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) seguiram as metodologias descritas por Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente. Foi utilizado o processamento seqüencial com coloração Giemsa convencional, bandamento C e coloração com nitrato de Prata (Ag-NORs) para uma identificação mais precisa dos cromossomos.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a razão de braços (Levan; Fredga; Sandberg, 1964) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

A localização dos sítios de rDNA 18S e rDNA 5S nos cromossomos foi obtida pela hibridação fluorescente in situ (FISH), com sondas obtidas de *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1837) (Teleostei, Prochilodontidae) (HATANAKA; GALETTI JR. 2004) e de *Leporinus elongatus* (VALENCIENNES, 1850) (Teleostei, Anostomidae) (MARTINS; GALETTI JR. 2001), respectivamente. A FISH seguiu a metodologia descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986).

Resultados

Não foi possível diferenciar morfológicamente *A. altiparanae* de *A. lacustris*, pois suas características morfométricas e merísticas se sobrepõem (GARUTTI; BRITSKI, 2000), dificultando a identificação. Assim, essas espécies são referidas apenas como populações do grupo “*bimaculatus*”, juntamente com o local de coleta.

Todas as populações apresentaram o mesmo número diplóide, $2n=50$ cromossomos. Entretanto, foram verificadas peculiaridades quanto aos cariótipos. No rio Piumhí, à jusante da cachoeira até as proximidades da foz, foram encontradas cinco formas cariotípicas (citótipos) distintas: citótipo A ($8m+34sm+2st+6a$) em seis exemplares, B ($8m+33sm+2st+7a$) em quatro exemplares, C ($8m+32sm+2st+8a$) em sete exemplares, D ($8m+31sm+2st+9a$) em três exemplares e E ($8m+30sm+2st+10a$) em oito exemplares (figura 13). Na cabeceira do rio Piumhi, a montante da cachoeira, foi encontrado apenas o citótipo C ($8m+32sm+2st+8a$) em todos os 23 exemplares analisados (figura 13).

As populações do rio Grande (29 exemplares) e do córrego Monjolinho (seis exemplares) corresponderam ao citótipo C ($8m+32sm+2st+8a$), diferentemente das populações do rio São Francisco com a foz do rio Piumhi (28 exemplares) e do ribeirão dos Patos (20 exemplares), todas representativas do citótipo A ($8m+34sm+2st+6a$) (figura 13).

A distribuição de heterocromatina apresentou-se variável entre e dentro das populações analisadas, não sendo possível a identificação de bandas diagnósticas de cada população. Foram evidenciados pequenos blocos heterocromáticos pericentroméricos no braço longo de vários os cromossomos submetacêntricos e metacêntricos e em alguns acrocêntricos (figura 14). O par 22, na maioria dos indivíduos, apresentou heterocromatina no braço curto (figura 14).

Todos os espécimes apresentaram sítios de Ag-NORs no braço curto do par subtelocêntrico 22 (figura 14), co-localizados com heterocromatina, mas na população do rio Piumhí foram observados três sítios adicionais de Ag-NORs (figura 14). Entretanto, as populações não se diferenciaram quanto ao número e a localização dos sítios de DNA ribossômico. O rDNA 18S foi localizado no par subtelocêntrico 22 (figura 15), confirmando

os dados de Ag-NORs, e o rDNA 5S foi observado no terceiro par de metacêntricos (figura 15).

Discussão

Todas as populações de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*”, analisadas até então, apresentaram $2n=50$ cromossomos, mas com diferenciações quanto às fórmulas cariotípicas (JIN; TOLEDO, 1975; MORELLI et al., 1983; PAGANELLI, 1990; PACHECO et al., 2001; DANIEL-SILVA, 2001; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007). Nas bacias do São Francisco (excetuando o rio Piumhi) e do Alto Paraná não foram verificadas variações intra-populacionais e, em cada bacia, foi observado um citótipo particular, ou seja, A e C, respectivamente. Assim, o citótipo A pode ser considerado padrão para a bacia do São Francisco e o citótipo C padrão para a bacia do Alto Paraná. Em contraste, no rio Piumhi foram encontrados cinco citótipos distintos em simpatria, entre eles A e C. Os demais citótipos (B, D, E) foram observados em simpatria em quase toda a extensão do rio Piumhi. Na foz e na cabeceira do rio foram encontrados somente os citótipos A e C, respectivamente.

O trecho do rio Piumhi, da cabeceira ao dique de Capitólio, pertencia à bacia do Alto Paraná antes da transposição e, provavelmente, era habitado por populações do citótipo C, como observado a montante da cachoeira. Por outro lado, o trecho à jusante do canal de transposição, anteriormente formado pelos ribeirões Água Limpa e Sujo, pertencia à bacia do São Francisco e deveria ser habitado pelo citótipo A. Com a transposição do rio Piumhi, o citótipo C teve possibilidade de migrar à jusante e o citótipo A à montante do canal de transposição. Contudo, a migração do citótipo A deve ter se estendido somente até a região da cachoeira, localizada no antigo curso do rio Piumhi, a qual impede completamente o fluxo a sua montante. Por sua vez, não ocorrem barreiras físicas que possam ter impedido a migração do citótipo C, bem como dos citótipos B, D e E, para o rio São Francisco. Entretanto, estes citótipos não foram amostrados no rio São Francisco e nem na foz do rio Piumhi. Assim, caso estejam presentes no rio São Francisco, provavelmente ocorrem em número reduzido, dificultando sua amostragem.

Os citótipos A e C diferenciam-se pela substituição de um par de cromossomos acrocêntricos por um par de cromossomos submetacêntricos. Os demais citótipos (B, D, E) são caracterizados por variações gradativas no número de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos. Embora três citótipos com variações quanto aos cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos já tenham sido encontrados para uma outra população do grupo “*bimaculatus*”, do município de Tamarana, PR, Brasil (bacia do Alto Paraná) (PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001), nenhum deles mostra correspondência com os citótipos agora descritos.

Entre os citótipos A a E ocorre uma diminuição contínua do número de cromossomos submetacêntricos, concomitantemente a um aumento no número de cromossomos acrocêntricos (figura 13). Tal fato sugere que os citótipos B, D e E possam ter se originado a partir de um processo de hibridação entre os citótipos A e C, ocorrido após a transposição. Esta hipótese encontra apoio na distribuição geográfica dos citótipos B, D e E, uma vez que os mesmos só foram observados na região onde provavelmente teria ocorrido o contacto e a mistura dos citótipos A e C.

A distribuição de heterocromatina constitutiva foi semelhante em todas as populações, com a presença de blocos heterocromáticos pericentroméricos no braço longo de vários pares de cromossomos. Esse tipo de distribuição foi também verificado em outras populações do grupo “*bimaculatus*” da bacia Alto Paraná (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; DOMINGUES et al., 2007) e do rio São Francisco (PAGANELLI, 1990), não se apresentando, assim, como um marcador cromossômico eficiente na discriminação das populações analisadas.

A ocorrência de Ag-NORs múltiplas é uma característica comum no grupo “*bimaculatus*” (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; ALBERDI; FENOCCHIO, 1997; PACHECO; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2001; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006). Contudo, todas as populações ora analisadas apresentaram apenas um par cromossômico portador de Ag-NORs (par 22), o que foi também confirmado pela localização dos sítios rDNA 18S por FISH. Embora na população do rio Piumhi mais três sítios de Ag-NORs tenham sido aparentemente

identificados, tal fato não foi comprovado pela análise de FISH. Por outro lado, Almeida-Toledo et al. (2002), utilizando FISH com sonda de rDNA 28S, observaram NORs múltiplas em populações da bacia do Alto Paraná e do rio São Francisco, ambas com 4 sítios, mas somente dois desses sítios foram evidenciados pelo nitrato de Prata (Ag-NORs). Quanto aos sítios de rDNA 5S, esses normalmente são menos variáveis em *Astyanax* que os sítios de NORs. Em todas as populações analisadas foram observados apenas dois sítios, localizados em posições idênticas de cromossomos aparentemente invariáveis. Resultados similares foram também obtidos para outras populações do grupo *bimaculatus* (ALMEIDA-TOLEDO et al. 2002; FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2006; DOMINGUES et al. 2007).

De modo geral, as diferenciações entre as populações do grupo *bimaculatus* das bacias do Alto Paraná e do São Francisco ficaram restritas às distintas fórmulas cariotípicas associadas a substituição de cromossomos acrocêntricos por cromossomos submetacêntricos, ou vice-versa. A. Tal fato, juntamente com o polimorfismo cromossômico observado no rio Piumhi, onde provavelmente houve a mistura entre os citótipos A e C, sugere que populações do grupo “*bimaculatus*” das bacias do Alto Paraná e do São Francisco estão estreitamente relacionadas e poderiam se cruzar, originando outros citótipos distintos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Proc. 05/58630-3), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Referências Bibliográficas

ALBERDI, A. J.; FENOCCHIO, A. S. Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. **Cytologia** v. 62, p. 171-176, 1997.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 97, p. 229-233, 2002.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 1, p. 103-120, 1978.

DANIEL-SILVA, M. F. Z. **Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes)**. 2001. 195p. Tese de doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DOMINGUES, M. S. et al. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotrop Ichthyol**, v. 5, p. 37-44, 2007.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genet Mol Biol**, v. 29, p. 464-468, 2006.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of the *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 328-332, 2004.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). **FishBase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>.

acesso em: 10 fev. 2008.

GARUTTI, V. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia**, v. 85, p. 115-122, 1998.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. 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. **Comum Mus Cienc Tecnol PUCRS Ser Zool**, v. 13, p. 65-88, 2000.

HATANAKA, T. E.; GALETTI JR., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae), **Genetica**, v.122, p. 239 – 244, 2004.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JIN, S. M.; TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cienc Cult**, v. 27, p. 1122-1124, 1975.

LEVAN, A.; FREDGA, K. E.; SANDBERG, H. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LIMA, F. C. T. et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; S. O. Kullander; Ferraris JR. C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910, 2001.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arq Mus Nac Rio de Janeiro**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, p. 445-448, 2005.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983.

PACHECO, R. B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytotypes and multiples NORs in na *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v. 5, p. 109-114, 2001.

PAGANELLI, H. H. **Diversidade cromossômica no gênero *Astyanax*, com especial referencia a *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758): Considerações citotaxonômicas e evolutivas**. 1990. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São carlos, São carlos, 1990.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p 2934-2938, 1986.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman Ltd, 1990. 434p.

Tabela 2. Localidade, coordenadas geográficas e número de espécimes analisados por sexo

Localidade	Coordenadas	M	F	I	Total
Cachoeira do Rio Piumhi	20° 27' 11"S; 46° 17' 00"W	0	1	2	3
Cabeceira do rio Piumhi	20° 27' 44"S; 46° 17' 33"W	0	2	27	29
Cabeceira do rio Piumhi	20° 26' 33"S; 46° 15' 58"W	2	17	4	23
Cabeceira do rio Piumhi	20° 26' 55"S; 46° 17' 46"W	2	1	1	4
Ribeirão das Araras	20° 26' 16"S; 45° 55' 40"W	1	1	0	2
Ribeirão dos Patos	20° 26' 11"S; 45° 47' 31"W	13	9	1	23
Rio Piumhi (foz do ribeirão Minhoca)	20° 31' 55"S; 46° 02' 42"W	4	23	1	28
Rio Grande (Jusante Furnas)	20° 39' 17"S; 46° 12' 59"W	1	10	18	29
Rio São Francisco (foz do rio Piumhi)	20° 20' 31"S; 45° 59' 03"W	4	31	2	37
Córrego Monjolinho	21° 59' 08"S; 47° 52' 55"W	2	5	0	7

M = macho; F = fêmea; I = sexo indeterminado

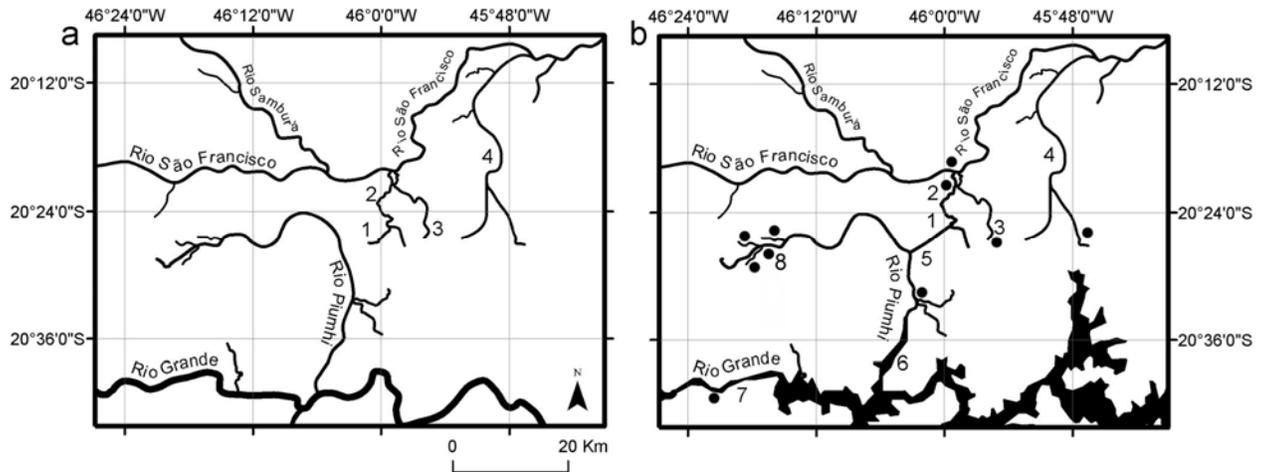


Figura 12. Região de transposição do rio Piumhi. a: Situação anterior à construção da hidrelétrica de Furnas. b: Situação atual. 1 = ribeirão Água Limpa; 2 = ribeirão Sujo; 3 = ribeirão das Araras; 4 = ribeirão dos Patos; 5 = canal de transposição; 6 = dique de Capitólio; 7 = usina hidrelétrica de Furnas; 8 = cachoeira da Usina; ● = pontos de coleta.

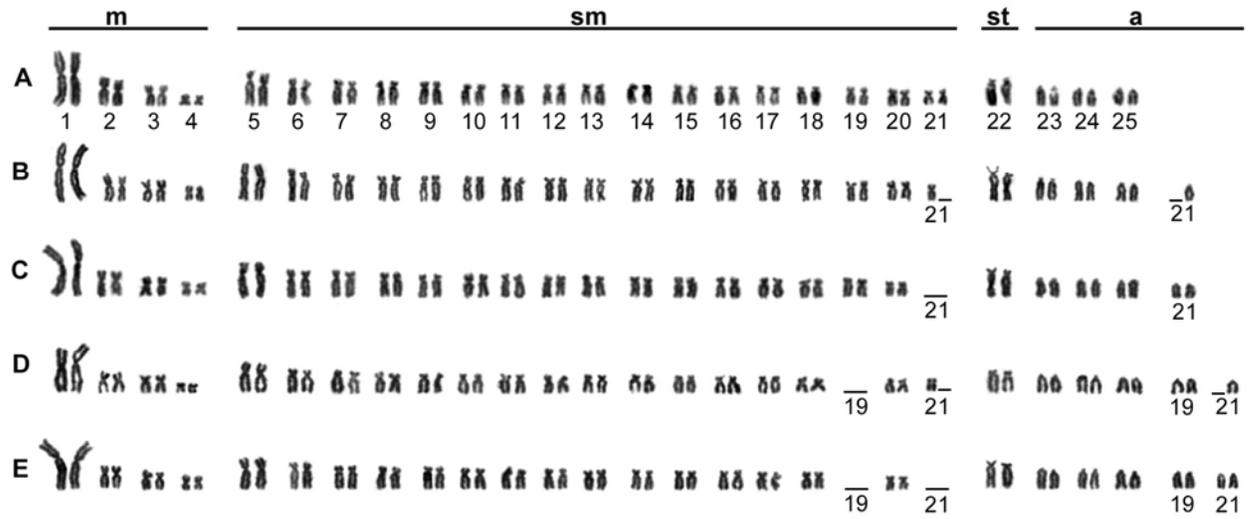


Figura 13. Citótipos detectados para os espécimes analisados de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*”. m = cromossomos metacêntricos; sm = submetacêntricos; st = subtelocêntricos; a = acrocêntricos. A= espécimes do São Francisco; C= espécimes do Alto Paraná; B, D e E= forma encontradas semente no rio Piumhi

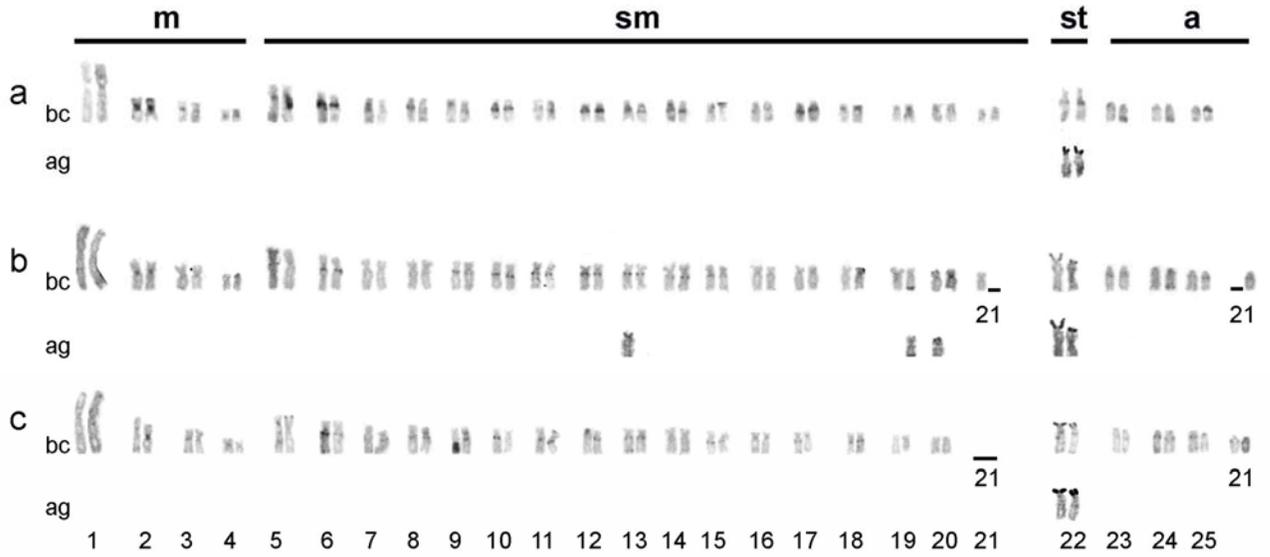


Figura 14. Cariótipos de espécimes de *Astyanax* do grupo "*bimaculatus*", analisados de forma seqüencial por bandamento C (bc) e Ag-NORs (ag). a = bacia do São Francisco; b = rio Piumhi; c = bacia do Alto Paraná.

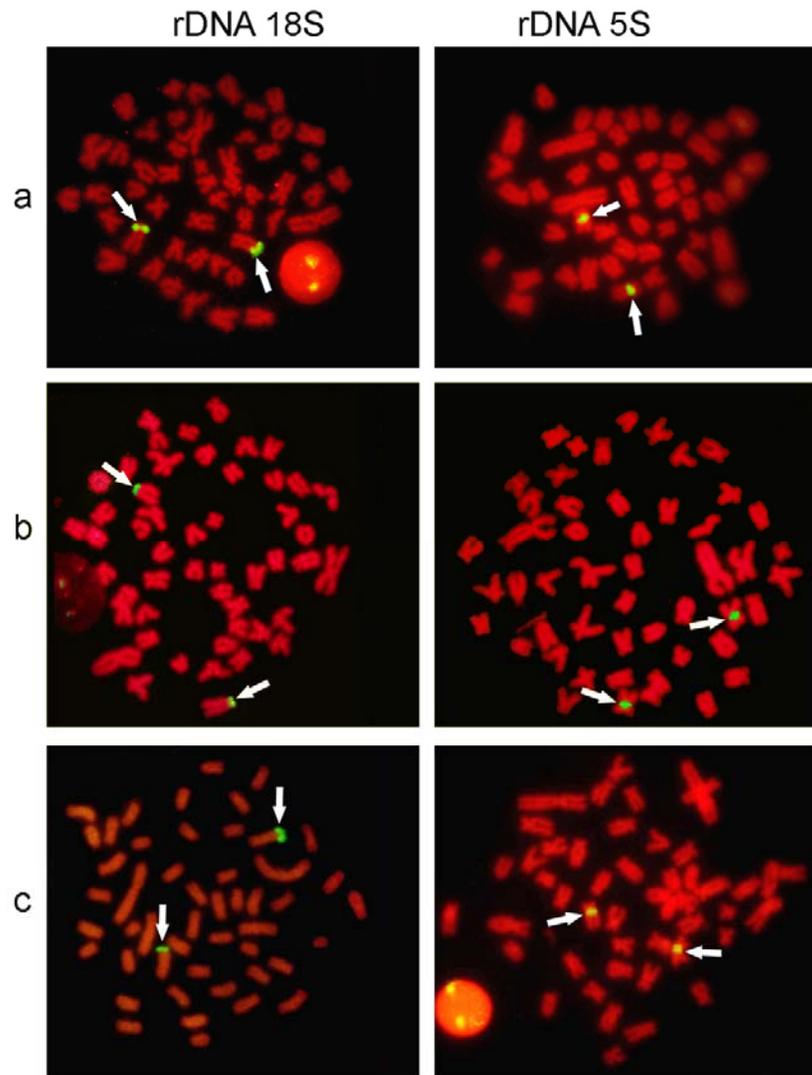


Figura 15. Hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e rDNA 5S em espécimes de *Astyanax* do grupo “*bimaculatus*” do rio Grande (a), rio Piumhi (b) e rio São Francisco (c).

5 Considerações finais

Astyanax fasciatus sensu Eigenmann (1921) é encontrado nas principais bacias hidrográficas brasileiras, dentre elas as bacias do Alto Paraná e São Francisco. Entretanto, são encontradas variações morfológicas e citogenéticas consideráveis entre as populações tradicionalmente identificadas como *A. fasciatus* sugerindo um complexo de espécies. Os dados cromossômicos aqui apresentados corroboram essa hipótese. As populações analisadas da bacia do Alto Paraná diferiram das populações do São Francisco quanto a quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva, sítios de DNA satélite As-51, sítios de Ag-NORs, sítios de rDNA 18S e rDNA 5S.

A transposição do rio Piumhi possibilitou o contato entre populações de *Astyanax fasciatus* da bacia do São Francisco com uma população invasora oriunda da bacia do Alto Paraná. Entretanto, não foram observados indivíduos com características cromossômicas intermediárias entre essas duas populações. Tal fato reforça a hipótese que as populações de *A. fasciatus* das duas bacias em questão podem constituir unidades taxonômicas distintas. Nesse sentido, a população oriunda da bacia do Alto Paraná pode ser considerada uma espécie invasora, que pode eventualmente causar impactos negativos nas populações residentes da bacia do São Francisco. De fato, no leito do antigo ribeirão Água Limpa e em parte do ribeirão Sujo foi observado somente à forma oriunda da bacia do Alto Paraná sugerindo a impossibilidade de sintopia entre as duas formas.

Recentemente, a população de *A. bimaculatus* que habita a bacia do Alto Paraná foi elevada a espécie e recebeu o nome *A. altiparanae*, em referência a sua distribuição (Garutti; Britski, 2000). Do mesmo modo, a população de *A. bimaculatus* que habita a bacia do São Francisco foi elevada a espécie regatando-se o nome *A. lacustris* (Lütken, 1875). Entretanto, no presente trabalho não foi possível distinguir morfológicamente essas duas espécies. O mesmo correu com os dados cromossômicos. As populações coletadas na bacia do Alto Paraná e do São Francisco apresentaram o mesmo número de cromossomos, de sítios de rDNA 18S e rDNA 5S. A diferenciação ficou restrita as fórmulas cariotípicas. As populações da bacia do São Francisco

apresentaram um citótipo constituído por $8m+32sm+2st+8a$ diferentemente das populações da bacia do Alto Paraná que apresentaram citótipo com $8m+34sm+2st+6a$, ou seja, há variação em apenas um par de cromossomos que passa de acrocêntrico em um citótipo para submetacêntrico no outro.

No rio Piumhi, onde provavelmente houve o contato entre *A. altiparana* e *A. lacustris* em decorrência da transposição, foram observados esses dois citótipos em simpatria. Entretanto, outros três citótipos foram também observados, nesse mesmo rio. Esses três citótipos também são formados por variações entre cromossomos submetacênticos e acrocêntricos sugerindo que podem ser formas intermediárias entre os citótipos encontrados nas bacias do Alto Paraná e São Francisco. Assim, os dados cromossômicos aqui apresentados, bem como a dificuldade em distinguir, com base em caracteres morfológicos, *A. altiparanae* de *A. lacustris*, indicam que essas duas espécies nominais possam, na realidade, constituir uma só unidade taxonômica, com diferenças populacionais.

O presente estudo contemplou um grupo peixes de difícil identificação morfológica que habitam as bacias do Alto Paraná e São Francisco. Foram analisadas populações isoladas, bem como populações onde ocorreu provavelmente mistura das duas faunas em função da transposição do rio Piumhi. Os dados cromossômicos permitiram identificar a população invasora de *A. fasciatus*, mas não diferenciaram as populações do grupo "*bimaculatus*", sugerindo que *A. altiparanae* e *A. Lacustris* se tratam de uma mesma espécie. Entretanto, essa hipótese deve ser confirmada com outros marcadores citogenéticos e moleculares.

6 Referências Bibliográficas

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. A. L. As Regiões organizadoras de nucléolo em peixes. **Cienc Cult**, v. 37, p. 448-453, 1985.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 97, p. 229-233, 2002.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Biodiversity and fisheries management in the Paraná river basin: Successes and Failures.** In: World Fisheries Trust. (Org.). Canada: BLUE MILLENIUM., 2002, 28 p.

AREFJEV, V. A. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia**, v. 43, p. 291-304, 1990.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 1, p. 103-120, 1978.

BOJSEN, B. H.; BARRIGA, R. Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. **Freshw Biol**, v. 47 p. 2246-2260, 2002.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res**, v. 8, p. 111-118, 2000.

BRINN, M. N. A.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas**, v. 141, p. 1-6, 2004.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de Identificacao de peixes da região de Três Marias**: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, 1988. 115 p.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: COMISSÃO INTERESTADUAL DA BACIA PARANÁ-URUGUAY. **Poluição e piscicultura**: notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP: Instituto de Pesca, 1972. p. 79-108.

CASTRO, M. C. R et al., (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, p.1-31, 2003.

CASTRO, R. M. C.; MENEZES, N. A. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In: CASTRO, R. M. C (Org.) **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil**: síntese do conhecimento ao final do século XX, 6: Vertebrados, São Paulo: WinnerGraph – FAPESP, p. 1-13, 1998.

Companhia Energética de Minas Gerais, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. p. 144.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon Basin. **Caryologia**, v. 55, p. 37-45, 2002.

CENTOFANTE, L. et al. Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei: Characidae). **Ichthyol Explor Freshwaters**, v. 14, p. 361-368, 2003.

CESTARI, M. M.; GALETTI JR., P. M. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Braz J Genet**, v. 15, p. 555 – 567, 1992.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenet Genome Res**, v. 109, p. 497-501, 2005.

DUDGEON, D. The ecology of tropical Asian rivers and streams in relation to biodiversity conservation. **Annu Rev Ecol Syst**, v. 31, p. 239-263, 2000.

DYNESIUS, M.; NILSSON, C. Fragmentation and flow regulation of river systems in northern third of the world. **Science**, v. 266, p. 753-762, 1994.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool**, V 43, p. 209-310, 1921.

FERRO, D. A. M. et al. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55–62, 2001.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, p. 107-114, 1989.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). **FishBase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. acesso em: 10 fev. 2007.

FURNAS. Disponível em: <http://www.furnas.com.br>. Acesso em: 09 fev. 2007.

GALETTI, JR., P. M.; SILVA, E. B.; CERMINARO, R. T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Braz J Genet**, v. 8, p. 479-484, 1985.

GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of Neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v. 47, p. 289-297, 1994.

GARUTTI, V. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Tocantins, Brasil. **Iheringia**, v. 85, p. 115-122, 1998.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. 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. **Comum Mus Cienc Tecnol PUCRS Ser Zool**, v. 13, p. 65-88, 2000.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HATANAKA, T. E.; GALETTI JR., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae), **Genetica**, v.122, p. 239 – 244, 2004.

IBAMA. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doprata.htm>. Acesso em: 09 fev. 2007.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 56, p. 281-287, 2003.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, v. 54, p. 453-461, 2003.

KAVALCO, K. F. et al. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenet Genome Res**, v. 106, p. 107-110, 2004.

KRUEGER, C. C.; MAY, B. Ecological and genetic effects of salmonid introductions in North America. **Can J Fish Aquat Sci**, v. 48, p. 66-77, 1991.

LATINI, A. O.; PETRERE JR., M. Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fish Manag Ecol**, v. 11, p. 71-79.

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenet Cell Genet**, v. 26, p. 36-40, 1980.

LEVAN, A.; FREDGA, K. E.; SANDBERG, H. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LIMA, F. C. T. et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; S. O. Kullander; Ferraris JR. C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

MACK, R. N. et al. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecol Appl**, v.10, p. 689-710, 2000.

MALABARBA, L. R. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major Clades (Ostariophysi: Characidae). In: MALABARBA, L. R. et al. (Org.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 199-233.

MANTOVANI, M.; ADEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 123, p. 211-216, 2005.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Two 5S arrays in Neotropical fish species: is it general rule for fishes?. **Genetica**, v. 111, p. 439-446, 2001a.

MARTINS, C.; GALETTI JR., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v. 44, p. 903-910, 2001b.

MELO, F. A. G. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. **Arq Mus Nac Rio de Janeiro**, v. 59, p. 1-46, 2001.

MELO, F. A. G. **Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. 2005. 269p. Tese de doutorado - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MESTRINER, C. A et al. Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* in an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

MILLS, E. L. et al. Exotic Species and the Integrity of the Great Lakes: Lessons from the Past. **BioScience**, v. 44, p. 666-676, 1994.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Braz J Genet**, v. 14, p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotrop Ichthyol**, v. 3, p. 445-448, 2005.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of fish Order Ostariophysi. **Chromosoma**, v. 24, p. 59-66, 1968.

OGUTU-OHWAYO, R., 1990. The decline of the native fishes of lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticus*, and the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environ Biol Fishes**, v. 27, p. 81-96, 1990.

OLIVEIRA, C. et al. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Braz J Genet**, v. 11, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C. et al. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, v. 79, p. 473-476, 1997.

ORSI, M. L.; AGOSTINHO, A. A. Fish species introduction by accidental escape from aquaculture in the high Paraná River Basin. **Rev Bras Zool**, v. 16, p. 557-560, 1999.

PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra Editorial, 1982, 292p.

PAIVA, M.P. **Peixes e pescas de águas interiores do Brasil**. Brasília: Editerra Editorial, 1983. 158p.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p 2934-2938, 1986.

RICCIARDI, A.; ATKINSON, S. K. Distinctiveness magnifies the impact of biological invaders in aquatic ecosystems. **Ecol Lett**, v. 7, p. 781–784, 2004.

RICKLEFS, R. E. *The Economy of Nature*. Freeman, New York, 1993.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supranumerary B Chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Braz J Genet**, v. 16, p. 601-615, 1993.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50-56, 1992.

SCHEEL, J. J. **Fish chromosomes and their evolution**. Charlottenlund Danmarks: Danmarks Akvarium, 1973. Internal Report.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. **Cytobios**, v. 83, p. 273-281, 1995.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUNAGA, T.; VERANI, J. R. The fish communities of the lakes in the Rio Doce Valley, Northeast Brazil. **Verh Internat Verein Theor Angew Limnol**, v. 24, p. 2563-2566, 1991.

VANZOLINI, P. E.; REBOUÇAS, R.; BRITSKI, H. A. Caracteres morfológicos de reconhecimento específico em três espécies simpátricas de lambaris do gênero *Astyanax* (PISCES, Characidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 16, p. 267-299, 1964.

ZARET, T. M.; PAINE, R. T. Species introduction in a tropical lake. **Science**, v. 182, p. 449-455, 1973.

ZIESLER, R.; ARDIZZONE, G. D. **The inland waters of Latin America**. Copescal Technical Papers. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, 171p, 1979.

WASKO, A. P. et al. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, v. 44, p. 893-902, 2001.