



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

**Estudos evolutivos em Auchenipteridae (Siluriformes): citogenética, DNA
mitocondrial e DNA satélite.**

Roberto Laridondo Lui

**SÃO CARLOS
2013**

Estudos evolutivos em Auchenipteridae (Siluriformes): citogenética, DNA mitocondrial e DNA satélite.

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

**Estudos evolutivos em Auchenipteridae (Siluriformes): citogenética, DNA
mitocondrial e DNA satélite.**

Roberto Laridondo Lui

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da
Universidade Federal de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor em
Ciências, Área de Concentração: Genética e
Evolução.**

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

**SÃO CARLOS
2013**

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

L952ee

Lui, Roberto Laridondo.

Estudos evolutivos em Auchenipteridae (Siluriformes) :
citogenética, DNA mitocondrial e DNA satélite / Roberto
Laridondo Lui. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
137 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2013.

1. Citogenética de peixes. 2. Evolução cromossômica. 3.
Fusão cromossômica. 4. Cromossomos B. 5. Elementos
repetitivos. 6. Iodeto de propídeo. I. Título.


CDD: 597.087322 (20^a)

“Estudos evolutivos em Auchenipteridae (Siluriformes):
citogenética, DNA mitocondrial e DNA satélite”

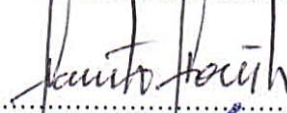
Tese de Doutorado de
ROBERTO LARIDONDO LUI

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Orlando Moreira Filho


.....

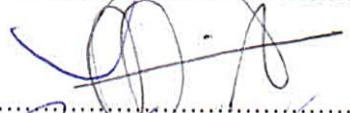
Prof. Dr. Fausto Foresti


.....

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni


.....

Prof. Dr. Alberto Sérgio Fenocchio


.....

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere


.....

Dedico aos meus pais

Célia e Roberto

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTO LARIDONDO LUI – Nasceu em 21 de Setembro de 1982, na cidade de São José do Rio Preto, SP, Brasil. Iniciou sua graduação em 2003 na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* Cascavel, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Durante a graduação foi monitor das disciplinas: Zoologia dos Invertebrados Inferiores em 2004, Genética Geral e Humana em 2005, Genética Humana em 2006 e Genética Molecular em 2006 e 2007. Foi orientado de iniciação científica do Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido entre os anos de 2004 e 2007, bolsista CNPq-PIBIC entre 2006 e 2007, e recebeu o prêmio de Destaque de Menção Honrosa no XVI Encontro Anual de Iniciação Científica. Entre 2005 e 2006 também participou da rede Proteopar (Análise Proteômica do Estresse Hídrico em Cafeeiro) pela UNIOESTE. Tornou-se Mestre em 2010 com a dissertação intitulada “*Análises comparativas citogenética e do DNA mitocondrial em Parauchenipterus galeatus Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae) coletados no Alto rio Paraná, no Alto rio São Francisco e no rio Piumhi: um enfoque biogeográfico*” (FAPESP – Processo 2007/57302-8), sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido (UNIOESTE), junto ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar, com menção de Louvor. Em seguida ingressou no Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido (UNIOESTE), sendo bolsista FAPESP (Processo 2009/15780-6). Durante esse período, participou de vários projetos de pesquisa coordenados por seu orientador e co-orientador. Apresenta dez artigos publicados em periódicos da área, três aceitos e um capítulo de livro. Participou de vinte e quatro eventos científicos, apresentando um trabalho completo, três resumos expandidos e quarenta e sete resumos em anais de congressos. Ministrou seis cursos de curta duração e participou como membro efetivo de três bancas de trabalhos de conclusão de curso de graduação. Recentemente, foi aprovado em 1º lugar no 31º Concurso Público de provas

e títulos para provimento de cargo de professor de ensino superior da UNIOESTE para área/matéria de Genética e no 4º Processo seletivo simplificado para contratação de docente por prazo determinado da UNIOESTE para a área/matéria de Genética.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à (ao)

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

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

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, e aos professores a ele credenciados pela ajuda quando necessária.

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

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis pela licença de coleta concedida (Licença 10538-1).

Instituto Estadual de Floresta pelo apoio nas coletas realizadas em Minas Gerais.

Gerência e funcionários do Parque Estadual do rio Doce pela licença de coleta na unidade de conservação e apoio logístico.

Professor Orlando Moreira Filho pela confiança, liberdade de trabalho, excelente orientação, amizade e apoio incondicional dado durante esses últimos anos, não só do doutorado, mas desde o primeiro momento que cheguei a São Carlos.

Professor Vladimir Pavan Margarido por continuar acreditando, orientando e aconselhando durante todos esses anos desde a graduação, exercendo não só o ótimo papel de orientador científico, mas também de um grande amigo.

Professores Luiz Bertollo, Roberto Artoni e Marcelo Vicari por estarem sempre prontos a ajudar com discussões, correções de trabalhos e ótimas idéias.

Professor Paulo Cesar Venere da UFMT que foi muito prestativo abrindo as portas de seu laboratório e até de sua casa nos auxiliando com grande esforço nas coletas na bacia do rio Araguaia, região de Barra do Garças.

Professores Liano Centofante (UFMT) e Sandra Mariotto (IFMT) que sempre nos receberam e nos ajudaram com muito empenho nas coletas no Pantanal.

Sr. Osmar Pereira de Barros, proprietário da fazenda Ana Maria em São Miguel do Araguaia, que abriu sua propriedade nos hospedando e disponibilizando funcionários para auxiliar nas coletas nessa região.

Professores Sergio Makrakis e Maristela Makrakis, e alunos do Getech (Grupo de Pesquisa em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos) pelo auxílio nas coletas no rio Iguaçu.

Professores Heraldo A. Britski e Osvaldo T. Oyakawa do Museu de Zoologia da USP pela identificação de cada uma das espécies deste trabalho.

Meus pais, Roberto e Célia, e minha irmã Rafaela, que mesmo distantes sempre estiveram acreditando e torcendo por esta e tantas outras conquistas de minha vida.

Minha namorada e noiva, Elaine, que teve grande paciência, dedicação e amor durante este doutorado.

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

Amigos do laboratório de Citogenética (Eli, Josi, Ju, Marcelo e Nicolas), pela ajuda e por compartilharem durante estes últimos anos, bons momentos dentro e fora do laboratório. Em especial ao Daniel, um amigo e irmão que ganhei em São Carlos.

Técnicos da citogenética, Piau e Gallo, pelo ótimo trabalho em coletas e no dia a dia de nosso laboratório. A dedicação de vocês nas coletas foi fundamental.

Aos outros colegas dos laboratórios do departamento de Genética e Evolução e outros departamentos, pelas valiosas discussões de trabalho, ajudas e momentos de descontração.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bacias Hidrográficas Brasileiras e Ictiofauna.....	2
1.1.1. Bacia do rio Araguaia	2
1.1.2. Bacia do rio da Prata	3
1.1.3. Bacia do rio Doce.....	4
1.1.4. Bacia do rio São Francisco.....	5
1.2. Siluriformes	6
1.3. Auchenipteridae	7
1.4. Histórico Taxonômico de <i>Parauchenipterus</i>	8
1.5. Estudos Citogenéticos em Auchenipteridae	9
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Pontos de coleta amostrados	14
3.2. Foto das espécies coletadas	18
3.3. Tratamento <i>in vivo</i>	22
3.4. Tratamento <i>in vitro</i>	23
3.5. Indução do número de mitoses	23
3.6. Classificação dos cromossomos	24
3.7. Bandamento C	24
3.8. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo.....	25
3.9. Análise sequencial	25
3.10. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	25
3.11. Análises cariotípicas	26
3.12. Extração e quantificação de DNA	26
3.13. Amplificação, purificação e sequenciamento dos genes Citocromo B e Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial.....	27
4. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS)	29
5. RESULTADOS	36

Capítulo I - O papel da fusão cromossômica na evolução cariotípica do gênero <i>Ageneiosus</i> (Siluriformes, Auchenipteridae).....	37
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	40
Resultados.....	42
Discussão	42
Agradecimentos	47
Referências Bibliográficas.....	47
Figuras	53
Capítulo II - Amplificação de sequência telomérica e ausência de elemento repetitivo sugerem origem comum entre cromossomos B em peixes (Siluriformes, Auchenipteridae).....	55
Resumo	56
Introdução	57
Materiais e Métodos	58
Resultados.....	60
Discussão	63
Agradecimentos	67
Referências Bibliográficas.....	67
Figuras	73
Capítulo III - Análise cromossômica comparativa e considerações evolutivas sobre duas espécies do gênero <i>Tatia</i> (Siluriformes, Auchenipteridae).....	75
Resumo	76
Introdução	77
Materiais e Métodos	78
Resultados.....	79
Discussão	80
Agradecimentos	83
Referências Bibliográficas.....	83
Figuras	87
Capítulo IV - Mapeamento físico de elementos repetitivos e fragmentação populacional de <i>Glanidium ribeiroi</i> (Siluriformes, Auchenipteridae).....	89
Resumo	90
Introdução	91
Materiais e Métodos	94

Resultados.....	95
Discussão	95
Agradecimentos	100
Referências Bibliográficas.....	100
Figuras	106
Capítulo V - Iodeto de Propídeo torna as regiões de heterocromatina mais evidentes no bandamento-C	109
Resumo	110
Introdução	111
Materiais e Métodos	113
Resultados.....	113
Discussão	114
Agradecimentos	117
Referências Bibliográficas.....	117
Figura.....	124
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
Anexo I - Análise cromossômica e do DNA mitocondrial de espécies de dois gêneros de Auchenipteridae: uma contribuição para a taxonomia de <i>Parauchenipterus</i>	128
Introdução	129
Materiais e Métodos	129
Resultados.....	133
Referências Bibliográficas.....	136

LISTA DE FIGURAS

MATERIAIS e MÉTODOS

Figura 1 Mapa da América do Sul com os todos os locais de coleta	15
Figura 2 Exemplar de <i>Ageneiosus inermis</i> da bacia do rio Araguaia, município de Aragarças (MT)	18
Figura 3 Exemplar de <i>Glanidium ribeiroi</i> da bacia do rio Iguaçu, município de Capanema (PR)	18
Figura 4 Exemplar de <i>Parauchenipterus galeatus</i> de uma lagoa marginal ao rio São Francisco, município de Lagoa da Prata (MG)	18
Figura 5 Exemplar de <i>Parauchenipterus galeatus</i> da Lagoa dos Tropeiros, bacia do rio Piumhi, município de Capitólio (MG)	19
Figura 6 Exemplar de <i>Parauchenipterus galeatus</i> do Reservatório de Jupιά, rio Paraná, município de Três Lagoas (MS)	19
Figura 7 Exemplar de <i>Parauchenipterus galeatus</i> da Lagoa Arroombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT)	19
Figura 8 Exemplar de <i>Parauchenipterus galeatus</i> de lagoa marginal ao córrego do Medo, bacia do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO)	20
Figura 9 Exemplar de <i>Parauchenipterus striatulus</i> de lagoas do Parque Estadual do rio Doce, município de Baixa Verde (MG)	20
Figura 10 Exemplar de <i>Tatia jaracatia</i> da bacia do rio Iguaçu, município de Capanema (PR) ..	20
Figura 11 Exemplar de <i>Tatia neivai</i> da bacia do rio Machado, afluente do rio Bugre, bacia do Paraguai, município de Denise (MT)	21
Figura 12 Exemplar de <i>Trachelyopterus</i> sp. da Lagoa Arroombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT)	21

Figura 13 Exemplar de *Trachelyopterus coriaceus* de lagoa marginal ao córrego do Medo, bacia do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO)21

CAPÍTULO I

Figura 1 Cariótipo de *Ageneiosus inermis* corado com Giemsa e (b) sequencialmente C-bandado. Em destaque é apresentado o par cromossômico 20 impregnado pelo nitrato de prata53

Figura 2 Cariótipo de *Ageneiosus inermis* hibridizado com (a) rDNA 5S (digoxigenina, vermelho) e 18S (FITC, verde). Metáfases de *Ageneiosus inermis* hibridizados com (b) sequência telomérica [TTAGGG]_n e (d) repetições [GATA]_n. As setas indicam o par cromossômico 1 metacêntrico fusionado54

Figura 3 Par cromossômico 1 metacêntrico corado com Giemsa (a) C-bandado (b) e hibridizado com [TTAGGG]_n (c). Esquema em (d) representa o rearranjo de fusão que originou este par54

CAPÍTULO II

Figura 1 Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* (a, b) e *Trachelyopterus* sp. (c, d) corados com Giemsa (a, c) e sequencialmente C-bandados (b, d). Em destaque estão os cromossomos B das duas espécies corados com Giemsa e sequencialmente C-bandados, e os pares subtelocêntricos 23 e 22 portadores das RONS de *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp., respectivamente73

Figura 2 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp. hibridizadas com rDNA 5S (FITC – verde) e 18S (digoxinenina – vermelho). As setas indicam os cromossomos portadores do rDNA 5S e as cabeças de seta o rDNA 18S73

Figura 3 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* (a, b, c, d) e *Trachelyopterus* sp. (e, f, g, h) coradas com DAPI (a, c, e, g) e hibridizadas com sonda de sequência telomérica [TTAGGG]_n (b, f) e sequência [GATA]_n (g, h). As setas indicam os cromossomos B.....74

CAPÍTULO III

- Figura 1** Cariótipos de *Tatia jaracatia* (a, b) e *Tatia neivai* (c, d) corados com Giemsa (a, c) e sequencialmente C-bandados (b, d). Em destaque os pares portadores das RONS impregnados pelo nitrato de prata.....87
- Figura 2** Cariótipos de *Tatia jaracatia* e *Tatia neivai* hibridizados com rDNA 5S (FITC – verde) e 18S (digoxigenina – vermelho)88

CAPÍTULO IV

- Figura 1** Mapa e perfil longitudinal da bacia do rio Iguaçu, mostrando seus pontos de represamento e sua acidentada topografia. O ponto de coleta de exemplares de *Glanidium ribeiroi* deste trabalho está evidenciado com um asterisco106
- Figura 2** Cariótipo de *Glanidium ribeiroi* do rio Iguaçu (trecho final da bacia, município de Capanema - PR) corado com Giemsa (a) e C-bandado (b). Par portador das Ag-RONS (em destaque).....107
- Figura 3** Cariótipo de *Glanidium ribeiroi* do rio Iguaçu hibridizado com DNAr 18S (FITC, sonda verde) e 5S (Rodamina, sonda vermelha). Metáfases de *Glanidium ribeiroi* hibridizadas com sequência telomérica [TTAGGG]_n (b1 e b2) e repetições [GATA]_n (c1 e c2).....108

CAPÍTULO V

- Figura 1** Metáfases C-bandadas dos peixes neotropicais, *Parauchenipterus galeatus* (A, B) e *Apareiodon vladii* (C, D) coradas convencionalmente com Giemsa (A, C) e com o fluoróforo, iodeto de propídeo (B, D). As setas e as cabeças de seta indicam os cromossomos B de *P. galeatus* (A, B) e o cromossomo W de *A. vladii* (C, D), respectivamente.....124

LISTA DE TABELAS**MATERIAIS e MÉTODOS**

Tabela 1 Exemplares coletados e suas respectivas localidades16

CAPÍTULO II

Tabela 1 Frequência de cromossomos B em *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp.
.....62

CAPÍTULO IV

Tabela 1 Dados citogenéticos de diferentes populações de *Glanidium ribeiroi* do rio Iguaçu93

RESUMO

A ictiofauna de água doce neotropical é a mais diversa do mundo, com mais de 4.000 espécies descritas. Em território brasileiro, cerca de 2500 espécies de peixes de água doce são consideradas válidas, sendo a maioria formalmente descrita e uma pequena parcela em fase de descrição, entretanto, acredita-se que esse número possa ser significativamente maior. Auchenipteridae, que é restrita a região Neotropical, compreende 20 gêneros e cerca de 90 espécies das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro. Esse grupo é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Os estudos genéticos, tanto cromossômicos quanto moleculares, em Auchenipteridae, são escassos visto a grande diversidade de espécies dessa família e sua ampla distribuição geográfica. Assim este trabalho objetivou progredir o conhecimento nesta família, no que se refere aos estudos cromossômicos clássicos e moleculares nos gêneros *Ageneiosus*, *Parauchenipterus*, *Glanidium*, *Tatia* e *Trachelyopterus*, e na aplicação da análise de sequências do DNA mitocondrial para auxiliar na problemática taxonômica que envolve os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*. *Ageneiosus* é gênero mais amplamente distribuído entre as bacias hidrográficas sul-americanas. Apesar dos estudos cromossômicos na família ainda serem poucos, este gênero é o mais estudado em número de espécies, com variação do 2n de 54 a 56, diferindo do restante da família que apresenta 58. Foi realizada análise cromossômica de *A. inermis* da bacia do rio Araguaia. *Ageneiosus* apresenta uma organização genômica um pouco diferente quando comparada com as outras espécies de Auchenipteridae. Evidências indicam que uma fusão cromossômica originou o primeiro par metacêntrico, rearranjo que pode ser um evento basal para o gênero. Em relação aos cromossomos B, neste trabalho foi descrito o segundo caso de cromossomos B em Auchenipteridae (*Trachelyopterus* sp.), e levantada a hipótese de que os cromossomos B de *Trachelyopterus* sp. possam ter uma origem comum em relação aos cromossomos B de *P. galeatus*. Conforme esperado, os resultados confirmaram a grande proximidade filogenética entre os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, além de indicarem que os cromossomos B

das duas espécies possam apresentar origem comum, anterior à diversificação desses gêneros. No que se refere à *Tatia*, este gênero pertence à subfamília Centromochlinae e possui 13 espécies válidas. Destas, *T. jaracatia* e *T. neivai* representam as únicas duas espécies da drenagem Paraná-Paraguai. Foi realizada análise cromossômica dessas duas espécies, sendo estes os primeiros dados cromossômicos para o gênero. As duas espécies de *Tatia* apresentaram grande semelhança cromossômica, entretanto, quando comparadas com as outras de Auchenipteridae, foi possível identificar algumas diferenças na fórmula cariotípica, no padrão de heterocromatina e na distribuição do rDNA 5S, que parecem ser intrínsecas de *Tatia*. No tocante a *Glanidium ribeiroi*, esta espécie foi coletada no rio Iguaçu, sendo que sua fauna é caracterizada por elevado endemismo, o que se deve a dois fatores: sua acidentada topografia e ao antigo isolamento proporcionado pela formação das cataratas do Iguaçu. Foi realizada análise cromossômica de uma população de *G. ribeiroi* coletada em uma região no trecho final dessa bacia, e os resultados revelaram diferenças populacionais quando comparados com estudos prévios em outras populações do rio Iguaçu, o que deve estar relacionado com a acidentada topografia dessa bacia. Nesta tese, também foi apresentada uma adaptação da técnica de bandamento C, no que se refere à utilização de um corante fluorescente (iodeto de propídeo), em vez do corante não-fluorescente (Giemsa). Esta modificação gera maior contraste das bandas heterocromáticas de cromossomos metafásicos, podendo ser valiosa principalmente quando os organismos apresentarem heterocromatinas pálidas e de difícil visualização. Por fim, os dados referentes aos gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, tanto por análise cromossômica quanto pela análise de dois genes mitocondriais, serão utilizados na discussão de um trabalho ainda em preparação, que envolve a validação ou não de *Parauchenipterus*, gênero que vem sendo assunto de debate no âmbito taxonômico.

ABSTRACT

The neotropical freshwater fish fauna is the most diverse in the world, with more than 4.000 described species. In Brazil, about 2.500 species of freshwater fishes are considered valid, and the most formally and a small portion under description, however, it is believed that this number can be significantly higher. Auchenipteridae, which is restricted to the Neotropical region, comprise 20 genus and about 90 species, of which 74 have been recorded for the Brazilian territory. Genetic studies, both chromosomal or molecular, in Auchenipteridae, are few since the great diversity of species in this family and their wide geographic distribution. Thus, this thesis was developed with the goal of advance the knowledge in this family, specifically with regard to chromosomal studies classical and molecular in the genus *Ageneiosus*, *Parauchenipterus*, *Glanidium*, *Tatia* and *Trachelyopterus*, and in the application of analysis of the DNA mitochondrial sequences to help in taxonomic problem involving the genus *Parauchenipterus* and *Trachelyopterus*. *Ageneiosus* is the genus most widely distributed among river basins of South America. Although chromosomal studies in the family are still few, this genus is the most studied in number of species, ranging from 54 to 56, differing from the rest of the family which present 58. Chromosomal analysis was performed in *A. inermis* of Araguaia river basin. *Ageneiosus* presents a slightly different genomic organization compared to the other species of Auchenipteridae. Evidences indicate that a chromosomal fusion that originated the first metacentric pair of *A. inermis*, can be a rearrangement basal for the genus. Regarding the B chromosomes, in this study, was described the second case of B chromosomes in Auchenipteridae (*Trachelyopterus* sp.), and it has been hypothesized that the B chromosomes this species may have a common origin in relation to the B chromosomes of *P. galeatus*. As expected, the results confirmed the great phylogenetic proximity between the genus *Parauchenipterus* and *Trachelyopterus*, moreover, indicated that the B chromosomes of the two species may present a common origin, prior to the diversification these genus. With regard to *Tatia*, this genus belongs to the subfamily Centromochlinae and has 13 valid species. Of these, *T.*

jaracatia and *T. neivai* represent the only two species of the Paraná-Paraguay drainages. Chromosomal analysis was performed these two species, and thus, the first chromosomal data were generated for the genus. The two species of *Tatia* showed large chromosomal similarity, however, when compared with the others of Auchenipteridae, was possible to identify some differences in the karyotype formula, in the pattern of heterochromatin and in the distribution of 5S rDNA, which appear to be intrinsic of *Tatia*. Regarding to *Glanidium ribeiroi*, this species was collected at the Iguazu river, being that its fauna is characterized by high endemism, which is due to two factors: its rugged topography and their old insulation provided by formation of Iguazu falls. Chromosomal analysis was performed in a population of *G. ribeiroi* collected in a region in the final stretch of this basin, and the results revealed populational differences when compared with previous studies in others populations of the Iguazu river, which must be related to the rugged topography of this basin. In this thesis, was also presented an adaptation of the banding C technique, with respect to the use of a fluorescent dye (propidium iodide), rather than of non-fluorescent dye (Giemsa). This adaptation produces greater contrast of the heterochromatin bands in metaphase chromosomes and can be especially valuable when the organisms studied possess heterochromatin that is pale and difficult to visualize. Finally, the data obtained concerning the genus *Parauchenipterus* and *Trachelyopterus*, both by chromosome analysis as by analysis of two mitochondrial genes, will be used in the discussion of a paper still in preparation, that involves the validation or not of *Parauchenipterus*, genus that has been subject of debate in the taxonomic .

1. INTRODUÇÃO

A citogenética de peixes no Brasil teve início na década de 70 e reúne hoje um dos maiores grupos de pesquisadores voltados a um campo de interesse comum, com diversos laboratórios de pesquisa distribuídos entre diferentes estados brasileiros, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul, alguns já mais antigos e bem consolidados, ao lado de outros mais recentes e em fase de consolidação.

O aperfeiçoamento progressivo de várias metodologias de estudo contribuiu para o avanço dessa área. Hoje, ao lado das técnicas mais tradicionais de análises (coloração convencional por Giemsa, Ag-RONs e bandamento C), outras metodologias propiciando bandamentos cromossômicos mais resolutivos (bandamento G, incorporação de análogos de bases, enzimas de restrição), além do emprego de fluorocromos base-específicos, análise de complexos sinaptonêmicos, hibridação fluorescente “*in situ*” com sondas de rDNA 18S e 5S e de DNA satélite, têm proporcionado a obtenção de resultados bastante positivos (Almeida-Toledo, 1998), comparáveis a aqueles que vem sendo obtidos em bons centros de estudo do exterior. Estudos citogenéticos têm se mostrado decisivo para o conhecimento e entendimento da diversidade ictiofaunística na região Neotropical.

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

1.1. Bacias Hidrográficas Brasileiras e Ictiofauna

A ictiofauna de peixes Neotropicais é a mais diversa do mundo, com mais de 4.000 espécies descritas (Reis et al. 2003), entretanto, estimativas do atual número podem chegar a 8.000 espécies (Schaefer 1998). Em território brasileiro, cerca de 2500 espécies de peixes de água doce são consideradas válidas, sendo a maioria formalmente descrita e uma pequena parcela em fase de descrição, entretanto, acredita-se que esse número possa ser significativamente maior. A razão desta grande diversidade se refere a um conjunto de fatores históricos, ecológicos e evolutivos que vêm ocorrendo a alguns milhões de anos desde a separação da Gondwana até o presente momento (Ribeiro 2006).

Essa grande diversidade de espécies de peixes presentes na região Neotropical, e mais especificamente em território brasileiro, está distribuída em uma enorme variedade de grandes e pequenas bacias hidrográficas, entre regiões de elevado e/ou baixo endemismo. Entre elas, podemos citar como os principais sistemas hidrográficos brasileiros, o Amazônico, São Francisco, Araguaia-Tocantins, Paraná-Paraguai, e bacias costeiras. Destes, o presente projeto inclui coletas de espécies pertencentes à família Auchenipteridae em pelo menos parte destes quatro últimos sistemas hidrográficos.

1.1.1. Bacia do rio Araguaia

A bacia Araguaia-Tocantins drena uma área de 918.822 km² que corresponde a cerca de 11% do território nacional. É a maior bacia situada inteiramente em território brasileiro e a segunda maior em termos de área, sendo inferior apenas a do Amazonas, que possui 3.869.953 km² (ANA, 2010a). O rio Araguaia possui sua nascente no limite sul da divisa entre os estados de Mato Grosso e Goiás. Próximo a essa região partem duas grandes bacias hidrográficas brasileiras: a bacia do Paraná-Paraguai e uma das bacias mais importantes do Brasil, a Araguaia-Tocantins. Segundo Innocencio (1989), o rio Araguaia percorre aproximadamente 2.115 km e é considerado um rio de planície. Suas águas são relativamente calmas, diferentemente das águas

do rio Tocantins, que é seu principal afluente e caracteriza-se, antes da confluência, pela presença de corredeiras e cachoeiras.

Aproximadamente 300 espécies de peixes já foram identificadas nesta bacia, sendo que algumas típicas da Amazônia central. Em seu curso superior, entretanto, há ocorrência de algumas espécies não amazônicas, sendo o exemplo mais conhecido, a tabarana (*Salminus hilarii*). Há ocorrência de muitas espécies endêmicas, principalmente no seu curso superior. De maneira geral, a diversidade e abundância de peixes na bacia do Araguaia diminuem da foz em direção das cabeceiras, o que se relaciona principalmente à ausência de áreas de inundação (IBAMA 2010a).

1.1.2. Bacia do rio da Prata

A bacia do rio da Prata, que é formada principalmente pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, drena uma região de aproximadamente 3,2 milhões de km² na América do Sul, ocupando 10,5% do território brasileiro. O rio Paraná é o principal rio da bacia do rio da Prata e o décimo maior do mundo em descarga (IBAMA 2010b). Sendo o segundo maior rio da América do Sul, percorre 4.695 km desde sua nascente na Serra da Mata da Corda - MG até o rio da Prata, dos quais 3.809 km dentro do território brasileiro drenando uma região de 891.000 km². Os rios Grande e Paranaíba, que são caracterizados como rios de planalto se juntam na região de Três Lagoas - MS para formar o rio Paraná (Agostinho e Júlio Jr 1999; Agostinho et al. 2004; IBAMA 2010b). A bacia do Paraná é composta por tributários de porte significativo, como se pode observar ao longo de seu percurso pelos rios Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema e Iguazu, entre outros (Agostinho et al. 2004; IBAMA 2010b).

O rio Iguazu possui cerca de 910 km de extensão sendo que suas cabeceiras estão presentes na porção Ocidental da Serra do Mar e sua foz no rio Paraná (Ministério das Minas e Energia 1990). Segundo Maack (1981), o rio Iguazu possui 42 afluentes em sua margem esquerda e 61 na sua margem direita. Com o surgimento das Cataratas do Iguazu há

aproximadamente 22 milhões de anos, as populações de peixes desta bacia foram isoladas da bacia do rio Paraná (MDK/CENCO 1987). Segundo Goodland (1975), a topografia do rio Iguaçu (quedas e corredeiras) impossibilita a migração de peixes, fato que poderia favorecer o processo de especiação dentro da bacia e que, aliado à formação das Cataratas do Iguaçu, pode explicar o considerável grau de endemismo desta ictiofauna.

A bacia do rio Paraguai é subdividida em duas partes: Alto rio Paraguai, que segue desde suas cabeceiras até a confluência com o rio Apa, e Baixo rio Paraguai, que segue deste ponto até a confluência com o rio Paraná. O rio Paraguai tem sua origem na porção oeste do estado do Mato Grosso a 298 metros de altitude; é o quinto maior rio da América do Sul e o principal afluente do rio Paraná. A ictiofauna do Alto e Baixo rio Paraguai difere ligeiramente; este fato pode ser explicado pelo antigo isolamento da porção superior (Alto rio Paraguai) desta bacia do restante da bacia do Paraná até o Holoceno, quando ocorreu a formação de um canal de conexão entre essas duas regiões (Resende 2004).

O Pantanal está presente no Alto rio Paraguai e é caracterizado por uma região de planície que permanece inundada durante grande parte do ano, tendo seus picos de cheia entre maio e agosto, e de baixa, de dezembro a janeiro. Os afluentes mais importantes da bacia do rio Paraguai no Pantanal são: Jauru, Sepotuba, Cuiabá, São Lourenço, Itiquira, Taquari, Negro, Aquidauana, Miranda e Apa (Resende 2004).

1.1.3. Bacia do rio Doce

A bacia do rio Doce situa-se na região sudeste do Brasil e compreende uma área de drenagem de 83.400 km², dos quais 86% pertencem ao Estado de Minas Gerais e 14% ao Espírito Santo (Simge 2010; ANA 2010b). O rio Doce, com uma extensão de 853 km, tem como formadores os rios Piranga e Carmo, cujas nascentes estão situadas nas encostas das serras da Mantiqueira e Espinhaço, onde as altitudes atingem cerca de 1.200 metros (ANA, 2010b).

Na área correspondente a essa bacia ocorrem cerca de 150 lagos, variando desde pequenos e rasos (profundidade média de 3 metros) até grandes e relativamente fundos (profundidade média de 20 metros). Complexos processos geológicos, iniciados a pelo menos 10.000 anos, de elevações tectônicas, aprofundamentos de vales por rios e atulhamento destes por material sedimentar modificaram o curso do rio Doce e seus tributários, isolando pequenos trechos que deram origem às lagoas atuais (Meis e Tundisi 1997). Segundo Santos (1976), alguns desses lagos encontram-se até 20 metros acima do nível desse rio. Essas e outras características, como o fato desses lagos não se comunicarem, constituindo ambientes isolados, tornam essa rede limnológica extremamente interessante para estudos biológicos (Bertollo 1978).

Levantamentos na década de 50 relativos à fauna ictiológica da bacia do rio Doce apontaram aproximadamente 35 espécies (Godinho 1996). Segundo Vasconcellos (2005), esse número foi reduzido, estando atualmente em 32 devido à introdução de algumas outras espécies que proporcionaram certo impacto ambiental nesta ictiofauna. Destas, apenas 17 são consideradas exclusivas da bacia do rio Doce, entre elas, *Parauchenipterus striatulus*.

1.1.4. Bacia do rio São Francisco

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

O rio São Francisco inicia seu curso no Planalto de Araxá, correspondendo às nascentes do rio Samburá, e sua foz no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas, percorrendo 2.863 km (Silva et al. 2003) e apresentando um desnível de aproximadamente 1.600 metros (Sato e Godinho 1999). Esse rio é dividido em quatro regiões: Alto São Francisco, que vai das nascentes até Pirapora-MG; Médio São Francisco, que vai de Pirapora até Remanso-BA;

Sub-médio São Francisco, que vai de Remanso até a cachoeira de Paulo Afonso; e Baixo São Francisco, que vai de Paulo Afonso até sua foz (Sato e Godinho 1999; IBAMA 2007a). Contém 36 tributários de porte significativo, dos quais 19 são perenes, e estão presentes em sua maioria no Alto São Francisco, enquanto as outras regiões são caracterizadas por possuir afluentes temporários (Sato e Godinho 1999; IBAMA 2007a).

Quanto à sua ictiofauna, já foram identificadas aproximadamente 150 espécies (Sato e Godinho 1999; IBAMA 2007a). Para a ordem Siluriformes já foram identificadas 71 espécies na bacia do São Francisco representando 12 famílias, sendo que Auchenipteridae é uma das famílias mais significativa contribuindo com 6 espécies (*Glanidium albescens*, *Parauchenipterus galeatus*, *Parauchenipterus leopardinus*, *Pseudauchenipterus flavescens*, *Pseudauchenipterus nodosus*, *Pseudotatia parva*) (Sato e Godinho 1999).

1.2. Siluriformes

Siluriformes compreende o segundo maior grupo de peixes da região Neotropical, possuindo 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (Ferraris Jr 2007), com distribuição maior em água doce na América do Sul e na África, havendo poucos grupos representados na Europa e na Ásia. Como exceção, a família Ictaluridae é predominante na América do Norte (Greenwood et al. 1966) e as famílias Ariidae e Plotosidae incluem representantes marinhos, além das famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae que apresentam espécies de estuário que às vezes penetram no mar (Pinna 1998). Segundo Buckup et al. (2007), essa ordem representa cerca de 40% das espécies presentes no Brasil com mais de 1.000 espécies válidas, distribuídas em 11 famílias e mais de 200 gêneros.

Os Siluriformes são peixes de hábito predominantemente noturno, orientando-se principalmente por sentidos químicos, que ao contrário dos caracídeos, possuem hábitos mais sedentários (Britski 1991). Quanto à morfologia, a principal característica é a ausência de escamas pelo corpo, o qual é totalmente recoberto por pele espessa ou placas ósseas.

Normalmente possuem três pares de barbilhões e maxilares pequenos. Frequentemente o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral é transformado em acúleo forte e a nadadeira adiposa encontra-se normalmente presente (Moyle e Chech 1988).

1.3. Auchenipteridae

Auchenipteridae, que é restrita a região Neotropical, compreende 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr 2007) das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares 2007). Segundo Ferraris Jr (2003) esse grupo é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae inclui somente os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende os outros 16 gêneros.

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

1.4. Histórico Taxonômico de *Parauchenipterus*

A taxonomia de *Parauchenipterus* é historicamente confusa e tem problemas desde a sua criação (Akama 2004). No princípio, a espécie-tipo utilizada para caracterizar *Parauchenipterus* foi *Silurus galeatus*, Bloch (1794), que deixou claro estar descrevendo a mesma espécie descrita por Linnaeus (1766), que por sua vez, se baseou numa ilustração feita por Seba (1759), não possuindo informação sobre a localidade de coleta desse exemplar. Esse fato é agravado por Linnaeus e Seba terem feito descrições simples que corresponderiam atualmente a qualquer espécie do gênero e, a manipulação desse material que serviu de base para o desenho de Seba ser algo complicado, pois o material zoológico onde estava esse exemplar foi leiloado e o seu destino é incerto (Akama 2004).

A partir dessa confusa descrição, várias modificações na sistemática do grupo foram realizadas, começando por Gunther (1864) que sinonimizou *Parauchenipterus* com *Auchenipterus* Valenciennes, 1840, e muitas espécies atualmente reconhecidas como *Parauchenipterus* acabaram sendo descritas nesse gênero. Algumas décadas depois, Eigenmann e Eigenmann (1888) retiraram *Parauchenipterus* dessa sinonímia, considerando-o sinônimo de *Trachycorystes* Bleeker, 1862 (hipótese corroborada por Britski 1972), ficando dessa forma por quase um século, quando Mees (1974), revalidou o gênero *Parauchenipterus*, e as espécies desse gênero passaram a ser colocadas em *Parauchenipterus* e *Trachycorystes*, gerando certa confusão de nomenclatura.

No estudo sobre as relações filogenéticas de Auchenipteridae realizado por Ferraris Jr (1988) em sua tese de doutorado, foi proposto pela primeira vez que *Parauchenipterus* seria sinônimo de *Trachelyopterus*. No ano seguinte, *Parauchenipterus* foi retirado dessa sinonímia, e os dois gêneros passaram a ser novamente válidos (Curran 1989). Para corroborar essa hipótese, Royero (1999) em sua tese de doutorado também realizando estudos sobre as relações filogenéticas dessa família considerou *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus* gêneros distintos.

Ferraris Jr (2003), no livro “Check List of Freshwater Fishes of South and Central America”, considerou os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus* sinônimos. Um ano depois, esses grupos foram novamente considerados distintos através de um estudo filogenético realizado nessa família com ênfase nesses gêneros por Akama (2004), em sua tese de doutorado, buscando esclarecer essa problemática. Para finalizar, Ferraris Jr (2007), no trabalho “Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types”, mantém a classificação como anteriormente utilizada em seu livro, conservando a sinonímia entre os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*; já Buckup et al. (2007) e Graça e Pavanelli (2007), em seus respectivos livros, passam a considerar esses dois gêneros válidos.

Segundo Akama (2004), essa confusa situação é consequência de quase dois séculos de decisões arbitrárias relacionada à sistemática de *Parauchenipterus*. Basta lembrar que a maioria das espécies relacionadas ao gênero não foram realmente descritas com o nome *Parauchenipterus* e estudos relacionados a esse grupo seriam de grande importância para auxiliar na diminuição dessa problemática. Após a revisão realizada por Akama (2004) apenas duas espécies para o gênero *Trachelyopterus* passaram a ser consideradas válidas: *Trachelyopterus coriaceus*, característico da bacia Amazonas-Araguaia e *Trachelyopterus* sp., característico da bacia do Paraná-Paraguai, as quais estão entre as espécies propostas de serem analisadas neste trabalho.

1.5. Estudos Citogenéticos em Auchenipteridae

Os estudos citogenéticos em Auchenipteridae são escassos e estão restritos apenas aos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010). Fenocchio e Bertollo (1992) analisando as espécies *Ageneiosus inermis* (citado como *Ageneiosus brevifilis*) e *Ageneiosus atronases* provenientes do rio Amazonas, encontraram um número diplóide igual a 56 cromossomos com diferentes fórmulas cariotípicas. Essas duas espécies apresentaram Ag-

RONs simples, porém diferencialmente localizadas, em posição terminal no braço curto de *A. brevifilis* e intersticial no braço longo de *A. atronases*, ambos em um par de cromossomos submetacêntricos.

Auchenipterus osteomystax (citado como *Auchenipterus nuchalis*) e *Parauchenipterus galeatus* da região de Porto Rico, rio Paraná, e *Glanidium ribeiroi* do reservatório de Salto Caxias, rio Iguaçu, foram analisadas por Ravedutti e Júlio Jr (2001) por meio de técnicas de citogenética clássica e apresentaram $2n=58$ cromossomos com diferenças na fórmula cariotípica e número fundamental. Os autores sugerem que essas diferenças na fórmula cariotípica são provenientes de mecanismos cromossômicos envolvendo inversões pericêntricas, duplicações e deleções. A impregnação pelo nitrato de prata demonstrou Ag-ROns simples nas três espécies, sendo em posição intersticial no braço curto de cromossomos submetacêntricos para *A. osteomystax* e *Glanidium ribeiroi* e em posição terminal no braço curto de *P. galeatus*. Segundo Ravedutti e Júlio Jr (2001), os dados citogenéticos obtidos sobre o grupo sugerem que o número diplóide igual a 58 cromossomos e as Ag-ROns localizadas em posição intersticial seja uma característica de Auchenipteridae.

Outras duas populações (Reservatórios de Segredo e Salto Osório) de *Glanidium ribeiroi* também do rio Iguaçu foram estudadas e o número diplóide igual a 58 também foi encontrado, entretanto pequenas diferenças relacionadas à fórmula cariotípica entre essas duas populações e a do reservatório de Salto Caxias podem ser observadas. Dados de mapeamento de rDNA 18S foram observados pela primeira vez para essa espécie nas populações dos reservatórios de Segredo e Salto Osório. Além disso, esses sítios de rDNA 18S se mostraram impregnados pela Cromomicina A₃, mas não marcados pelo bandamento C (Fenocchio et al. 2008).

Outras populações de *Parauchenipterus galeatus* de diferentes localidades (bacia do rio Paraná – Reservatório de Jupiaá, bacia do rio São Francisco – Lagoa da Prata e uma região de conexão entre elas, a bacia do rio Piumhi) foram recentemente estudadas com base em citogenética clássica e molecular. O número diplóide igual a 58 cromossomos manteve-se

constante entre as populações, entretanto, variações na fórmula cariotípica foram detectadas. A heterocromatina foi localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos e pericentromérica em alguns cromossomos acrocêntricos nas três populações. Ag-NORs apresentaram-se simples no braço curto de um par subtelocêntrico nas três populações, variando apenas o par portador deste sítio. Hibridização com sonda de rDNA 18S confirmou o par cromossômico evidenciado pela prata nas três populações. Os sítios de rDNA 5S estão localizados em dois pares cromossômicos submetacêntricos nas três populações variando apenas os pares portadores destas seqüências (Lui et al. 2009; Lui et al. 2010). Além disso, a primeira descrição de cromossomos B em Auchenipteridae foi realizada em uma dessas populações de *P. galeatus* (bacia do rio São Francisco, Lui et al. 2009).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os estudos citogenéticos em populações naturais de peixes de água doce Neotropicais têm gerado importantes informações sobre modificações da estrutura cromossômica que possivelmente são favorecidas pelo isolamento geográfico de populações presentes em diferentes bacias hidrográficas e microbacias, além de valiosos subsídios para a citotaxonomia (Moreira-Filho e Bertollo 1991; Souza et al. 1995). Paralelamente, o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado para a avaliação da variabilidade genética de populações de peixes (Prioli et al. 2002), além de sua utilização na identificação de espécies crípticas. Devido às informações que sua análise permite obter, o DNA mitocondrial torna-se uma excelente ferramenta para a análise de variações populacionais, tanto intra quanto interespecíficas. Somando-se aos dados da citogenética clássica e da biologia molecular, a prospecção de DNA repetitivo e sua distribuição no cariótipo das espécies têm também fornecido valiosas informações para estudos evolutivos e o melhor entendimento da organização genômica de diferentes organismos, incluindo também os peixes.

Assim sendo, os dados obtidos a partir de estudos genéticos (DNA mitocondrial) e citogenéticos (clássicos, moleculares e DNAs repetitivos), contribuíram com novas informações no que se refere à diversificação e evolução de espécies de peixes da família Auchenipteridae, notadamente dos gêneros *Ageneiosus*, *Parauchenipterus*, *Glanidium*, *Tatia* e *Trachelyopterus*. No que se refere especificamente a *Parauchenipterus*, este gênero demonstrou ser um modelo interessante sob a luz de diferentes metodologias de estudo, propiciando dados complementares que poderão auxiliar na problemática taxonômica associada a esse grupo. No tocante aos demais gêneros, além da necessidade de progredir no conhecimento científico desse grupo devido à carência de dados até então disponíveis, a sua distribuição em bacias

hidrográficas distintas propiciará uma análise comparativa entre distintas populações/espécies e um melhor entendimento de suas relações biogeográficas e evolutivas.

Com esse intuito, foram realizados estudos cariotípicos com abordagens da citogenética clássica e molecular, procurando analisar os rearranjos cromossômicos e o papel de seqüências repetitivas na diversificação e evolução desse grupo da ictiofauna Neotropical. Adicionalmente, foram também realizadas análises de seqüências de DNA mitocondrial, relacionadas aos genes: *citocromo oxidase I* e *citocromo B*, as quais trouxeram valiosas informações sobre a problemática taxonômica que envolve o gênero *Parauchenipterus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pontos de coleta amostrados

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas, redes de espera e varas de pesca. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas para laboratórios de pesquisa onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos e coleta de tecidos. Para a maioria das espécies, os peixes foram mantidos no laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), entretanto, para as espécies coletadas na bacia do rio Araguaia, região de Aragarças/Barra do Garças, divisa entre os estados de Goiás e Mato Grosso, os peixes foram mantidos no laboratório de Citogenética e Genética de Peixes do GEPEMA, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Campus Universitário do Araguaia. No total foram coletados exemplares de 8 espécies (12 populações) da família Auchenipteridae, as quais são oriundas de 9 localidades (Fig. 1, Tab. 1). Na página 15 está apresentado um mapa da América do Sul com todos os pontos amostrados e com indicação de cada espécie coletada. Nas páginas 16 e 17 encontra-se uma tabela com todas as espécies incluídas neste trabalho e os respectivos dados referentes a cada uma dessas localidades, além do sexo, o número de exemplares analisados, e o número de depósito em museu. Todos os exemplares deste trabalho foram identificados pelo professor Heraldo A. Britski do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.



Figura 1 Mapa da América do Sul com os todos os locais de coleta. O ponto 1, Lagoa Arrombado, bacia do rio Paraguai. O ponto 2, rio Machado, bacia do rio Paraguai. O ponto 3, Lagoa Marginal ao Córrego do Medo, afluente do rio Araguaia. O ponto 4, rio Araguaia. O ponto 5, Lagoa Verde, bacia do rio Doce. O ponto 6, lagoa marginal ao rio São Francisco. O ponto 7, Lagoa dos Tropeiros, bacia do rio Piumhi. O ponto 8, reservatório de Jupuíá, rio Paraná. O ponto 9, rio Iguaçu.

Tabela 1 Exemplos coletados e suas respectivas localidades

Espécie	Localidade	Município	Estado	GPS	BH	Sexo		Depósito
						♂	♀	
<i>Ageneiosus inermis</i> (Linnaeus, 1766)	Rio Araguaia	Aragarças	GO	15° 53' 03,9" S 52° 06' 17,9" O	A	6	13	MZUSP 109796
<i>Glanidium ribeiroi</i> (Haseman, 1911)	Rio Iguaçu	Capanema	PR	25° 35' 19,6" S 53° 54' 48,2" O	PA	23	26	MZUSP 109797
<i>Parauchenipterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	Lagoa Marginal ao rio São Francisco	Lagoa da Prata	MG	19° 56' 15,1" S 45° 32' 13,8" O	SF	3	3	MZUSP 100985
<i>Parauchenipterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	Lagoa dos Tropeiros, bacia do rio Piumhi	Capitólio	MG	20° 33' 99,3" S 46° 03' 21,6" O	SF	3	3	NUP 8613
<i>Parauchenipterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	Reservatório de Jupuíá, rio Paraná	Três Lagoas	MS	20° 44' 60,3" S 51° 39' 10,5" O	PA	3	3	NUP 8614
<i>Parauchenipterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	Lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá	Poconé	MT	16° 25' 40,9" S 56° 25' 07,4" O	PG	4	7	MZUSP 110804
<i>Parauchenipterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	Lagoa Marginal ao Córrego do Medo (Fazenda Ana Maria), afluente do rio Araguaia	São Miguel do Araguaia	GO	13° 08' 52,7" S 50° 25' 02,8" O	A	9	10	MZUSP 109793
<i>Parauchenipterus striatulus</i> (Steindachner, 1877)	Lagoa Verde (PERD*), bacia do rio Doce	Marliéria	MG	19° 49' 44,5" S 42° 37' 52,5" O	C	7	5	MZUSP 109798

Espécie	Localidade	Município	Estado	GPS	BH	Sexo		Depósito
						♂	♀	
<i>Tatia jaracatia</i> (Pavanelli & Bifi, 2009)	Rio Iguaçu	Capanema	PR	25° 35' 19,6" S 53° 54' 48,2" O	PA	7	3	MZUSP 109792
<i>Tatia neivai</i> (Iherig, 1930)	Rio Machado, bacia do rio Bugres, afluente do rio Paraguai	Denise	MT	14° 40' 43,2" S 57° 00' 47,0" O	PG	22	4	MZUSP 109794
<i>Trachelyopterus coriaceus</i> (Valenciennes, 1840)	Lagoa Marginal ao Córrego do Medo (Fazenda Ana Maria), afluente do rio Araguaia	São Miguel do Araguaia	GO	13° 08' 52,7" S 50° 25' 02,8" O	A	7	8	MZUSP 106766
<i>Trachelyopterus</i> sp.	Lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá	Poconé	MT	16° 25' 40,9" S 56° 25' 07,4" O	PG	3	4	MZUSP 110806

*PERD – Parque Estadual do rio Doce; GO – Goiás; MT – Mato Grosso; PR – Paraná; MG – Minas Gerais; GPS – Sistema de Posicionamento Global; BH – Bacia Hidrográfica; A – Araguaia; PA – Paraná; PG – Paraguai; SF – São Francisco; C – Costeira; MZUSP – Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; NUP - Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá.

3.2. Foto das espécies coletadas



Figura 2 Exemplar de *Ageneiosus inermis* da bacia do rio Araguaia, município de Aragarças (MT). Comprimento total = 38 centímetros; Comprimento padrão = 34 centímetros.



Figura 3 Exemplar de *Glanidium ribeiroi* da bacia do rio Iguaçu, município de Capanema (PR). Comprimento total = 18,5 centímetros; Comprimento padrão = 15,5 centímetros.



Figura 4 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus* de uma lagoa marginal ao rio São Francisco, município de Lagoa da Prata (MG). Comprimento total = 17,9 centímetros; Comprimento padrão = 15,6 centímetros.



Figura 5 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus* da Lagoa dos Tropeiros, bacia do rio Piumhi, município de Capitólio (MG). Comprimento total = 156 milímetros; Comprimento padrão = 127 milímetros.



Figura 6 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus* do Reservatório de Jupia, rio Paraná, município de Três Lagoas (MS). Comprimento total = 19,8 centímetros; Comprimento padrão = 16,9 centímetros.

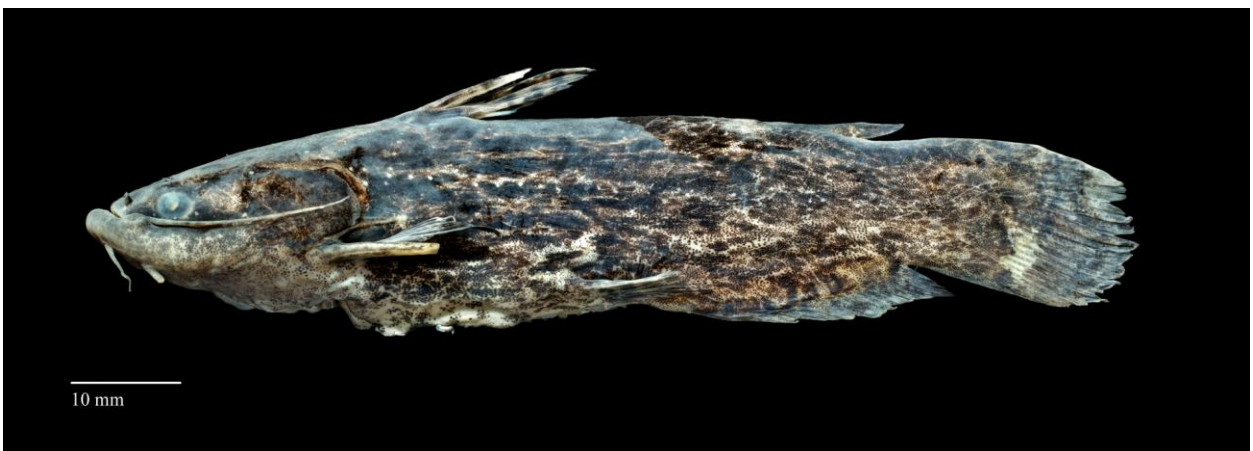


Figura 7 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus* da Lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT). Comprimento total = 91,8 milímetros; Comprimento padrão = 82,7 milímetros.



Figura 8 Exemplar de *Parauchenipterus galeatus* de lagoa marginal ao córrego do Medo, bacia do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO). Comprimento total = 160 milímetros; Comprimento padrão = 138 milímetros.



Figura 9 Exemplar de *Parauchenipterus striatulus* de lagoas do Parque Estadual do rio Doce, município de Baixa Verde (MG). Comprimento total = 20,0 centímetros; Comprimento padrão = 17,0 centímetros.



Figura 10 Exemplar de *Tatia jaracatia* da bacia do rio Iguaçu, município de Capanema (PR). Comprimento total = 58,0 milímetros; Comprimento padrão = 45,5 milímetros.



Figura 11 Exemplar de *Tatia neivai* da bacia do rio Machado, afluente do rio Bugre, bacia do Paraguai, município de Denise (MT). Comprimento total = 52,0 milímetros; Comprimento padrão = 39,6 milímetros.



Figura 12 Exemplar de *Trachelyopterus* sp. da Lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT). Comprimento total = 91,6 milímetros; Comprimento padrão = 73,3 milímetros.



Figura 13 Exemplar de *Trachelyopterus coriaceus* de lagoa marginal ao córrego do Medo, bacia do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO). Comprimento total = 74,5 milímetros; Comprimento padrão = 62,1 milímetros.

3.3. Tratamento *in vivo* (Bertollo et al. 1978)

Foi injetada na região abdominal do animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso do animal. Posteriormente, o peixe foi mantido em aquário bem arejado durante 50 a 60 minutos. Decorrido esse tempo, o animal foi sacrificado e porções do rim foram retiradas. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), e transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10 ml desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, incubou-se esta suspensão a 37°C, durante vinte minutos. Em seguida, o material foi re-suspendido, com cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador, recém preparado (3 metanol: 1 ácido acético) foram acrescentadas ao material que foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm, descartando o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se, vagarosamente, 5-7 mL de fixador, deixando escorrer pelas paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de fixador, misturando bem o material. Este foi guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, sendo posteriormente trabalhado conforme a descrição: pingar 2 a 3 gotas da suspensão obtida, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e aquecida ao redor de 50°C. Secou-se diretamente ao ar e corou-se com o corante Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 a 8 minutos. Finalmente a lâmina deve ser lavada com água destilada e seca ao ar.

3.4. Tratamento *in vitro* (Foresti et al. 1993)

Fragments do rim foram colocados em 10 mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida será transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se 1 a 2 gotas de solução de colchicina 0,0125%, misturando-a bem com o material. O material foi então transferido para estufa a 37°C, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi transferido novamente para estufa a 37°C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 10 gotas de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) misturado-as com o material repetidas vezes. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 10 mL de fixador, misturando o material repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação por 10 minutos e a fixação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Por fim, pingou-se o material sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 50°C. Após a secagem ao ar, seguiu-se a coloração do material com solução Giemsa 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 – 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

3.5. Indução do número de mitoses (Oliveira et al. 1988; Cavallini e Bertollo 1988)

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

intraperitonealmente na proporção de 1 mL/100 gramas de peso animal durante 24 horas, após o qual processou-se o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

3.6. Classificação dos cromossomos (Levan et al. 1964; Guerra 1986)

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

RB = 1,00-1,70 , metacêntrico (m);

RB = 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB = 3,01-7,00 , subtelocêntrico (st);

RB = 7,01- acrocêntrico (a).

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

3.7. Bandamento C (Sumner 1972 com modificações Lui et al. 2009)

As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60 °C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com o fluorocromo iodeto de propídeo na proporção de 20 µL de *anti-fading* / 0,7 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL).

3.8. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Howell e Black 1980)

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

3.9. Análise sequencial

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

3.10. Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos foi obtida pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel et al. (1986). Para todos os trabalhos foram utilizadas as sondas de rDNA 18S de *Prochilodus argenteus*, obtidas por Hatanaka e Galetti Jr (2004), e de rDNA 5S de *Leporinus elongatus* por Martins et al. (2000).

As sondas foram marcadas com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Biotin Nick Translation Mix e Dig 11 Nick Translation Mix, respectivamente; Roche). As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (etanol 70, 80 e 100%) por 5 min cada e incubadas com RNase (40µg/mL em 2xSSC) em câmara úmida a 37°C por 1h. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em

2xSSC a 70°C por 5 min e as sondas foram desnaturadas em solução de hibridação (formamida 50%, sulfato dextrano 10%, 2xSSC, DNA de placenta humana 200µg/µL, sonda 3,75 ng/µL, volume final de 400µL) a 100°C por 10 min. Posteriormente, foi colocados 50·µL da solução de hibridação em cada lâmina e incubado em câmara umedecida com formamida 60% overnight. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em solução de 2xSSC a 42°C por 20min e com 0,1xSSC a 60°C por 15 min. As lâminas foram encubadas em tampão 5% NFDM (No Fat Dry Milk 5%, 4xSSC). Posteriormente, incubou-se as lâminas em 90µL de FITC 2,5ng/µL em NFDM por 30 min, lavou-se com solução de 2xSSC por 15 min e incubou-se novamente agora com 90µL de anti-avidina 1% em NFDM por 30 min. Quando necessário, após lavagem com solução salina 2xSSC, o passo anterior foi repetido a fim de se amplificar o sinal. Por fim, as lâminas foram montadas com 25 µL de *antifading* e 1µL iodeto de propídeo (50µg/mL) e analisadas em microscopia de fluorescência.

3.11. Análises cariotípicas

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

As preparações de hibridação *in situ* e as colorações com fluorocromos foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. Com a utilização de uma câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50, as imagens selecionadas foram capturadas através do software DP2-BSW (Olympus).

3.12. Extração e quantificação de DNA

O DNA total foi isolado de pedaço de fígado preservado em etanol 100% e extraído com fenol através de método descrito por Sambrook et al. (1989). Após a extração do DNA total foi

realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras. Depois da quantificação, uma alíquota do DNA foi diluída a fim de se obter uma concentração final de 50 ng/ μ L para uso diário.

3.13. Amplificação, purificação e sequenciamento dos genes Citocromo B e Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial

Para amplificação de parte do gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial foram utilizados os primers FISHF1 (5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3') e FISHR1 (5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3') (Ward et al. 2005). Essa região foi amplificada por uma reação de PCR contendo 2,5 μ L de tampão de reação 10X, 0,65 μ L $MgCl_2$ (50mM), 4,0 μ L dNTP Mix (1,25 mM), 1,0 μ L de cada primer (10 μ m), 2 μ L DNA (50 ng/ μ L), 0,2 μ L Taq Polimerase (5 U/ μ L) e 13,65 μ L de H_2O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C (2 minutos), 36 ciclos de 94°C (30 segundos), 54°C (30 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (10 minutos).

Para amplificação de parte do gene Citocromo B do DNA mitocondrial foram utilizados os primers CytBL (5' AAY ATC TCY GCA TGA TGA AA 3') e CytBH (5' TCT TCG GAT TAC AAG ACC G 3'). Essa região foi amplificada através de uma reação de PCR contendo 5,0 μ L de tampão de reação 10X, 1,5 μ L $MgCl_2$ (50mM), 8,0 μ L dNTP Mix (1,25 mM), 2,0 μ L de cada primer, 2 μ L DNA (50 ng/ μ L), 0,4 μ L Taq Polimerase e 27,1 μ L de H_2O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (4 minutos), 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53°C (90 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (5 minutos).

Os produtos de amplificação de ambos os genes citados acima foram submetidos à purificação com PEG 8000 (Polietileno Glicol) (Sambrook et al. 2000), a fim de retirar os componentes da PCR que poderiam interferir na qualidade do sequenciamento destes produtos.

Para isso, foi adicionado 25 μ L de solução PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao produto de PCR (volume/volume), o qual foi incubado em estufa por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3900 x g (4000 rpm) durante 30 minutos e todo o sobrenadante foi, delicadamente, descartado. Foram adicionados 125 μ l de etanol 80% gelado nos pellets de produto de PCR que ficaram em cada um dos microtubos; em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 3900 x g por 30 minutos e retirou-se o etanol, cuidadosamente. Este passo foi realizado mais uma vez e as amostras foram colocadas para secagem em estufa a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 μ L de água ultrapura autoclavada e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente overnight para a total eluição dos pellets.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. As corridas foram feitas em capilares de 36 centímetros utilizando o polímero POP7. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador ABI 3730 DNA Analyser da Applied Bioystems. As seqüências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

4. REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS)

- Agostinho CS, Júlio Jr HF (1999) Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais (Ed. Lowe-McConnel). Edusp, 534 p.
- Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Júlio Jr HF (2004) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status (Eds. Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A). IDRC publications, 380p.
- Akama A (2004) Sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 375 p.
- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (Eds. Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS) Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Série Livros 23. Rio de Janeiro, 116-120.
- ANA (2010a) Agência Nacional de Águas. Plano Estratégico de Recursos Hídricos das Bacias dos rios Tocantins e Araguaia. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/GestaoRecHidricos/PlanejHidrologico/pbhta/apresentacoes/2Reuniao25-09-06/Documentos/unidades/Apresentacao.PDF>>. Acesso em 08 de agosto.
- ANA (2010b) Agência Nacional de Águas. Disponível em: <<http://www.ana.gov.br/cbhriodoce/bacia/caracterizacao.asp>>. Acesso em 08 de agosto.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120.
- Bloch ME (1794) Naturgeschichte der ausländischen Fische 8: 361-396.
- Britski HA (1972) Sistemática e evolução dos Auchenipteridae e Ageneiosidae (Teleostei, Siluriformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 146 p.
- Britski H (1991) Peixes de água doce. In: Atlas de fauna brasileira (Ed. Carvalho, JCM). Melhoramento. São Paulo, 84-93.

- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, 195 p.
- Cavallini MM, Bertollo LAC (1988) Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: II Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Maringá, PR, 32.
- Curran DJ (1989) Phylogenetic Relationships Among the Catfish Genera of the family Auchenipteridae (Teleostei: Siluroidea). *Copeia* 1989: 408-419.
- Eigenmann CH, Eigenmann RS (1888) Preliminary notes on South American Nematognathi. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 1: 119-172.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype, C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios* 72: 19-22.
- Fenocchio AS, Dias AL, Margarido VP, Swarça AC (2008) Molecular cytogenetic characterization of *Glanidium ribeiroi* (Siluriformes) endemic to the Iguazu river, Brazil. *Chromosome Science* 11: 61-66.
- Ferraris Jr CJ (1988) The auchenipteridae: Putative monophyly and sistematics, with a classification of the neotropical Doradoid catfishes (Ostariophysi: Siluriformes). Tese de doutorado. City University of New York. New York, 229 p.
- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: Check List of Freshwater Fishes of South and Central America (Eds. Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ). EDIPUCRS. Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49: 810-813.

- Godinho AL (1996) Peixes do Parque Estadual do Rio Doce. Belo Horizonte: Instituto Estadual de Floresta/UFMG, 48 p.
- Goodland R (1975) Usina Hidrelétrica Foz do Areia: reconhecimento do impacto ambiental. Curitiba, COPEL.
- Graça WJ, Pavanelli CS (2007) Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, 241 p.
- Greenwood PH, Rosen DE, Weitzman SH, Myers GS (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 131: 339-456.
- Guerra MS (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira de Genética* IX: 741-743.
- Günther A (1864) Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. Londres 5, 455 p.
- Hatanaka, T, Galetti Jr., PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- IBAMA (2007a) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Bacia do São Francisco. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_dosaofrancisco.htm>. Acesso em 07 de agosto.
- IBAMA (2010a). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis. Bacia do Araguaia-Tocantins. Disponível em :

- <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doaraguaiaatocantins.htm>. Acesso em 08 de agosto.
- IBAMA (2010b). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Bacia do Prata. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doprata.htm>. Acesso em 08 de agosto.
- Innocencio NR (1989) Hidrografia. In: Geografia do Brasil, Região Centro-Oeste. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Rio de Janeiro. Vol. 1, 73-90.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Linnaeus C (1766) *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio Duodecima. Reformata, 532 p.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552-559.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Maack R (1981) Geografia Física do Estado do Paraná. Segunda edição. Curitiba: Secretaria da Cultura e Esporte do Governo do Estado do Paraná, 442 p.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133: 39-46.
- Mees GF (1974) The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *Zoologische Verhandelingen* 132: 1-246.

- Meis MRM, Tundisi JG (1997) Geomorphological and Limnological Processes as a Basis for Lake Typology. The Middle Rio Doce Lake System. In: Tundisi JG, Saijo Y. Limnological Studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil. Academia Brasileira de Ciências/USP, 25-50.
- MDK/CENCO (1987) Usina Hidrelétrica de Segredo: Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Relatório de Impacto Ambiental, Curitiba.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics* 14: 331-357.
- Moyle PB, Chech JJ (1988) Fishes - an introduction to ichthyology. Prentice Hall. Segunda edição, 559 p.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227-236.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934-2938.
- Pinna MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Phylogeny and classification of Neotropical Fishes (Eds. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS). Edipucrs. Porto Alegre, 279-330.
- Prioli SMAP, Prioli AJ, Júlio Jr. HF, Pavanelli CS, Oliveira AV, Carrer H, Carraro DM, Prioli LM (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25: 421-430.
- Ravedutti CG, Júlio Jr HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66: 65-70.

- Resende EK (2004) Migratory fishes of the Paraguay-Paraná basin excluding the Upper Paraná basin. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A. Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. IDRC publications, 380 p.
- Reis RE, Kullander SO, Ferrari Jr CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDPUCRS, Porto Alegre.
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4: 225-246.
- Royero RL (1999) Studies on the systematics and phylogeny of the catfish family Auchenipteridae (Teleostei: Siluriformes). Tese de Doutorado. University of Bristol, 377 p.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Segunda edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook J, MacCallum P, Russel D (2000) Molecular cloning: a laboratory manual. Terceira edição. Dallas: Cold Spring Harbor Laboratory Press. University of Texas Southwestern Medical Center.
- Santos RS (1976) Necessidade de estudo da ictiofauna das lagoas do Parque Florestal do rio Doce, Estado de Minas Gerais. Anais do I Encontro Nacional sobre Limnologia, Piscicultura e Pesca Continental, Belo Horizonte, 455-457.
- Sato Y, Godinho HP (1999) Peixes da Bacia do Rio São Francisco. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais (Eds. Lowe-McConnell RH). Edusp, 534 p.
- Sato Y, Godinho HP (2004) Migratory fishes of the São Francisco river. In: Migratory fishes of South America: Biology (Eds. Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A). Fisheries and Conservation Status. IDRC publications, 380 p.
- Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP,

- Lucena ZMS, Lucena CAS. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, 375–400.
- Seba A (1759) *Locupletissimi rerum naturalium thesauri accurata descriptio et iconibus artificiosissimis expressio per universam physices historian*. Volume III.
- Silva PA, Vieira GG, Farinasso M, Carlos RJ (2003) Determinação da extensão do rio São Francisco. *Anais da XI SBSR*. Belo Horizonte, 393-400.
- SIMGE (2010) Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos de Minas Gerais. Disponível em: http://www.simge.mg.gov.br/alerta/doce/bacia_hidrografica/index.html>. Acesso em 21 de agosto.
- Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1995) Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. *Cytobios* 83: 273-281.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Vasconcellos MG, Assumpção AM, Soares AS, Lucca JV, Verani JR, Fenerich-Verani N, Rocha O (2005) Análise da diversidade de espécies de peixes de 4 lagoas do Sistema de Lagos do Vale do Médio Rio Doce – MG, em relação à ocorrência de espécies exóticas. In: Rocha O, Espíndola ELG, Fenerich-Verani N, Verani JR, Rietzler AC. *Espécies invasoras em águas doces. Estudos de caso e propostas de manejo*. Editora da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 416 p.
- Vari RP, Malabarba LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. pp. 1-11. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 360: 1847-1857.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão sendo apresentados em forma de capítulos: havendo dois que foram aceitos nos periódicos: *Neotropical Ichthyology* e *Comparative Cytogenetics* (Capítulos I e III, respectivamente); dois que estão em fase final de preparação e em breve serão enviados para avaliação em periódicos a serem escolhidos (Capítulos II e IV); e um que foi publicado no periódico *Biotechnic & Histochemistry* (Capítulo V).

Em seguida é apresentado o título de cada um desses capítulos:

Capítulo I – *O papel da fusão cromossômica na evolução cariotípica do gênero Ageneiosus (Siluriformes, Auchenipteridae).*

Capítulo II – *Amplificação de sequência telomérica e ausência de elemento repetitivo sugerem origem comum entre cromossomos B em peixes (Siluriformes, Auchenipteridae).*

Capítulo III – *Análise cromossômica comparativa e considerações evolutivas sobre duas espécies do gênero Tatia (Siluriformes, Auchenipteridae).*

Capítulo IV – *Mapeamento físico de elementos repetitivos e fragmentação populacional de Glanidium ribeiroi (Siluriformes, Auchenipteridae).*

Capítulo V – *Bandamento C: maior evidência de heterocromatina usando o fluoróforo iodeto de propídeo como corante.*

Capítulo I

O papel da fusão cromossômica na evolução cariotípica do gênero *Ageneiosus* (Siluriformes, Auchenipteridae)

Este trabalho está aceito na Revista Neotropical Ichthyology.

Resumo

Ageneiosus é o gênero de Auchenipteridae mais amplamente distribuído entre as bacias hidrográficas sul-americanas. Apesar dos estudos cromossômicos na família ainda serem poucos, este gênero apresenta o maior número de espécies analisadas, com variação do número diplóide de $2n=54$ a 56 , o que difere do restante da família ($2n=58$). O presente trabalho teve como objetivo analisar *Ageneiosus inermis* da bacia do rio Araguaia. O número diplóide encontrado foi de 56 cromossomos. A heterocromatina foi verificada na região terminal da maioria dos cromossomos, além de um bloco heterocromático pericentromérico no par 1, o qual se destaca pelo tamanho em relação aos outros pares cromossômicos. Ag-RON foi detectada em apenas um par cromossômico submetacêntrico, o que foi confirmado pela FISH. O rDNA 5S se mostrou presente em apenas um par cromossômico metacêntrico. A sequência $[TTAGGG]_n$ marcou todos os telômeros, além de um ITS na região proximal do braço curto do par 1. A sequência repetitiva $[GATA]_n$ mostrou-se dispersa, mas com preferencial localização na região terminal dos cromossomos. *Ageneiosus* apresenta uma organização genômica um pouco diferente quando comparada com as outras espécies de Auchenipteridae. Além disso, evidências indicam que uma fusão cromossômica originou o primeiro par metacêntrico em *A. inermis*, rearranjo que pode ser um evento basal para o gênero.

Palavras-Chave: Marcadores citogenéticos; sequência $[TTAGGG]_n$; sequência $[GATA]_n$; Bandamento-C; rDNA-FISH.

Introdução

Entre os Siluriformes, Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical, mais especificamente nas bacias hidrográficas das Américas Central e do Sul. Segundo Ferraris (2007), esta família abrange cerca de 90 espécies distribuídas em 20 gêneros, das quais 74 já foram catalogadas para o território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares 2007). Além disso, vem ocorrendo recentemente um número crescente de descrições de novas espécies para esta família, como por exemplo, a recente descrição de *Ageneiosus uranophthalmus* de rios da Amazônia Central (Ribeiro e Py-Daniel 2010), além de outras seis que estão para serem formalmente descritas para este mesmo gênero (Ribeiro 2011).

Os estudos citogenéticos em Auchenipteridae ainda são poucos, compreendendo apenas espécies dos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus*. *Ageneiosus inermis* do lago Catalão apresenta número diplóide de 54 cromossomos (Santos e Nakayama 2011), sendo que outra população desta mesma espécie e *Ageneiosus atronusus* (citado como *A. atronases*), ambos do rio Solimões (Fenocchio e Bertollo 1992), e *Ageneiosus dentatus* e *Ageneiosus ucayalensis*, ambos do lago Catalão (Santos e Nakayama 2011), apresentam número diplóide de 56 cromossomos. Entretanto, as espécies dos outros gêneros que apresentam estudos citogenéticos, como *Glanidium ribeiroi*, *Parauchenipterus galeatus* e *Auchenipterus osteomystax* (citado como *A. nuchalis*) possuem 58 cromossomos (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010).

O principal rearranjo cromossômico que pode levar a diminuição do número cromossômico é a fusão. A ocorrência de um evento de fusão cêntrica entre dois cromossomos telocêntricos ou acrocêntricos gerando um cromossomo metacêntrico é denominada fusão Robertsoniana (Robertson 1916). Tais rearranjos ocorrem alterando uma estrutura extremamente importante do cromossomo, o telômero. Essa estrutura especializada, localizada na porção terminal dos cromossomos é considerada importante para a estabilidade e integridade cromossômica (Zakian 1997), e para que ocorram tais rearranjos, é fundamental a eliminação ou

inativação dos telômeros (Slijepcevic 1998). Segundo este último autor, a explicação para a ocorrência de tais rearranjos resultaria basicamente como consequência de três possíveis hipóteses: 1) inativação da enzima telomerase, 2) quebra cromossômica em uma sequência satélite adjacente ao telômero ou 3) inativação do telômero. Vale ressaltar que somente se a última explicação ocorresse seria possível manter a estrutura da sequência telomérica em uma região intersticial (ITS). Esses rearranjos estão entre os mais importantes da evolução cariotípica de mamíferos (Holmquist e Dancis 1979), e alguns exemplos interessantes são encontrados na evolução de grupos de peixes (Giuliano-Caetano 1998; Margarido e Moreira-Filho 2008). Em Auchenipteridae, até o momento, *Ageneiosus* é o único gênero em que as espécies apresentam número diplóide diferente de 58 (i.e., 54 ou 56), dessa forma, é possível que rearranjos robertsonianos possam estar envolvidos na evolução do grupo.

O gênero *Ageneiosus* é o que apresenta a maior quantidade de dados cromossômicos em Auchenipteridae. *Ageneiosus inermis* é a espécie que apresenta a maior distribuição na América do Sul, estando em quase toda a porção a leste da cordilheira dos Andes (Ribeiro 2011), e é a espécie que apresenta mais estudos cromossômicos (e.g., Fenocchio e Bertollo 1992; Santos e Nakayama 2011), podendo o número diplóide ser $2n=54$ ou 56, o qual é inexistente para os outros gêneros de Auchenipteridae. Isto faz de *Ageneiosus* um interessante modelo para o estudo da evolução cromossômica em Auchenipteridae. O presente trabalho teve como objetivo analisar *Ageneiosus inermis* da bacia do rio Araguaia, e testar a hipótese de que fusões cromossômicas podem estar relacionadas à origem e diversificação de *Ageneiosus*.

Materiais e Métodos

Foi realizada análise cromossômica em 19 exemplares (6 machos e 13 fêmeas) de *Ageneiosus inermis* da bacia do rio Araguaia, município de Aragarças – GO, Brasil (15°54'00.1"S; 52°15'11.4"W). Os exemplares foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 109796). A preparação das

suspensões celulares de cromossomos mitóticos foi obtida de células do rim anterior (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1993) e classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a razão de braços (Levan et al. 1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão heterocromático foi determinado através da metodologia descrita por Sumner (1972) com modificações (Lui et al. 2012). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram identificadas utilizando o método descrito por Howell e Black (1980). Ambas as metodologias foram aplicadas sequencialmente, após a coloração convencional dos cromossomos por Giemsa (análise seqüencial).

As hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) foram realizadas segundo Pinkel et al. (1986), usando as sondas de rDNA 18S (Hatanaka e Galetti Jr 2004), rDNA 5S (Martins et al. 2000), [TTAGGG]_n e [GATA]_n, as quais foram amplificadas sem DNA molde pela reação descrita por Ijdo et al. (1991). A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina-16-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Biotin Nick Translation Mix - Roche). A sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Dig 11 Nick Translation Mix - Roche). As sequências [TTAGGG]_n e [GATA]_n foram marcadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando biotina-16-dUTP (Roche Applied Science). Todas as hibridizações foram realizadas com 77% de estringência (200 ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano, 2xSSC; pH 7.0 – 7.2). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51. O software DP2-BSW (Olympus) foi utilizado para a captura das imagens.

Resultados

O número diplóide encontrado para *A. inermis* foi de 56 cromossomos ($32m + 16sm + 4st + 4a$, $NF=108$) (Fig. 1a). A heterocromatina foi verificada nas regiões terminais da maioria dos cromossomos, sendo que em alguns cromossomos os blocos heterocromáticos se mostraram fortemente marcados (Fig. 1b). Além disso, foi detectado um bloco heterocromático pericentromérico no par 1 (Fig. 1b e 3b). Este par se destaca dos outros pares cromossômicos do complemento, devido o seu tamanho notavelmente maior.

A impregnação pelo nitrato de prata detectou somente o par submetacêntrico 20 marcado no braço curto em posição terminal, coincidente com um bloco heterocromático (Fig. 1, em destaque). A FISH com a sonda de rDNA 18S confirmou os resultados revelados pela impregnação com nitrato de prata (Fig. 2a), e a hibridização com as sondas de rDNA 5S mostrou apenas um par cromossômico, o par 4 metacêntrico no braço curto em posição intersticial, também coincidente com um bloco heterocromático (Fig. 2a). A hibridização com sonda de sequência telomérica $[TTAGGG]_n$ apresentou marcação nos telômeros de todos os cromossomos, além de um ITS (Interstitial Telomeric Site) na região proximal do braço curto do par 1 (Fig. 2b). A hibridização com a sequência repetitiva $[GATA]_n$ mostrou que essa sequência encontra-se dispersa em todo o genoma da espécie, mas com uma localização preferencial na região terminal dos cromossomos; entretanto, apesar de em menor quantidade, também se mostrou presente nas regiões intersticiais (Fig. 2d).

Discussão

Segundo Ribeiro (2011), o gênero *Ageneiosus* é o mais diverso e amplamente distribuído de Auchenipteridae, e a espécie *A. inermis*, é a espécie deste gênero que apresenta a maior distribuição nas bacias hidrográficas sul-americanas. O número diplóide ($2n=56$) encontrado para a população de *A. inermis* analisada no presente trabalho é igual ao encontrado para uma população do rio Solimões (Fenocchio e Bertollo 1992) (bacia Amazônica); entretanto, em

relação à população estudada do lago Catalão (também bacia Amazônica), um número diplóide menor ($2n=54$) foi encontrado (Santos e Nakayama 2011). Apesar da conservação do número diplóide entre a população do rio Solimões e a do presente trabalho, há algumas pequenas diferenças relacionadas à constituição cariotípica que podem ser decorrentes de translocações e/ou inversões pericêntricas, situação comumente observada em outras espécies de peixes, como *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) (Garcia et al. 2010; Martinez et al. 2011), *Parauchenipterus galeatus* (Auchenipteridae) (Lui et al. 2010), *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) (Blanco et al. 2010), *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae) (Mazzuchelli et al. 2007; Treco et al. 2008), *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae) (Bueno et al. 2012a, 2012b), entre outros.

Os poucos estudos cromossômicos em Auchenipteridae sugerem que o número diplóide igual a 58 é uma característica do grupo (Ravedutti e Júlio Jr 2001). Com exceção das espécies de *Ageneiosus*, as quais apresentam número diplóide diferente de 58, os outros gêneros que apresentam análises até o momento (*Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus*) confirmam essa maior ocorrência do número diplóide no grupo. Segundo Pinna (1998), a família Doradidae é considerada grupo-irmão de Auchenipteridae. Apesar do número diplóide em Doradidae variar de 56 a 66 (Eler et al. 2007), o número diplóide modal é de 58 cromossomos, sendo encontrado em 14 das 16 espécies já analisadas (Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008). Segundo Milhomem et al. (2008), o número diplóide igual a 58 deve ser considerado basal para Doradidae. Desta forma, é provável que esse mesmo número diplóide (58) também deva ser considerado basal para Auchenipteridae.

As espécies de Auchenipteridae analisadas pelo bandamento-C dos gêneros *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010) apresentam um padrão de distribuição de heterocromatina preferencialmente em regiões terminais, o qual parece ser uma característica na família. Entretanto, o gênero *Ageneiosus* destoa um pouco desse padrão, sendo que dois aspectos podem ser ressaltados: 1) as regiões heterocromáticas de espécies de *Ageneiosus* se apresentam

fortemente marcadas, diferentemente das outras espécies de Auchenipteridae, as quais se apresentam normalmente pálidas; 2) o par 1 metacêntrico apresenta um bloco pericentromérico fortemente marcado (Fig. 1). Apesar desses blocos heterocromáticos se apresentarem mais conspícuos, a localização preferencialmente terminal para a maioria dos cromossomos do cariótipo (característico de Auchenipteridae) se manteve.

Os dados disponíveis na literatura de hibridação com sonda de rDNA 18S para Auchenipteridae estão restritos apenas a *Parauchenipterus galeatus* (Lui et al. 2009; Lui et al. 2010) e *Glanidium ribeiroi* (Fenocchio et al. 2008), as quais sempre confirmaram os resultados apresentados pela prata de um par portador de RONS. Segundo Ravedutti e Júlio Jr (2001), Ag-RONS simples parece ser uma característica de Auchenipteridae. Os dados de mapeamento físico de rDNA 5S em Auchenipteridae estão restritos apenas a *P. galeatus*, localizados em posição intersticial de dois pares submetacêntricos, sendo um par no braço curto e o outro no braço longo (Lui et al. 2010). A localização intersticial no braço curto do par 4 metacêntrico em *A. inermis* sugere que esse par possa ser correspondente ao par cromossômico de *P. galeatus* que apresentam o sítio de rDNA 5S na mesma posição, ou seja, no braço curto. Além disso, a região em que foi detectado o rDNA 5S é coincidente com um bloco de heterocromatina.

As FISHs com os elementos repetitivos [GATA]_n e [TTAGGG]_n forneceu informações interessantes a respeito do genoma da espécie *A. inermis*. Em relação ao primeiro elemento, foi inicialmente descoberto por Epplen et al. (1982), e vários estudos subsequentes mostraram que esta sequência está conservada em diferentes espécies, incluindo humanos (Srivastava et al. 2008), além de parecer ter associação na determinação e evolução de cromossomos sexuais em grupos de cobras (Jones e Singh 1985). Embora nenhum sistema de cromossomos sexuais tenha sido descrito em Auchenipteridae, esta sequência altamente dispersa encontrada em *A. inermis* é um fator novo para o grupo, que deveria ser mais bem explorada em outras espécies. A hibridação com a sequência [GATA]_n se mostrou correspondente à localização das heterocromatinas na região terminal de quase todos os cromossomos, também estando presente

em menor quantidade em regiões intersticiais, e coincidente com a única região banda-C positiva pericentromérica (par 1). Elementos repetitivos amplamente dispersos no genoma de outras espécies de peixes vêm sendo recentemente observado (e.g., Mazzuchelli e Martins 2009; Teixeira et al. 2009; Ferreira et al. 2011).

Evidências de rearranjos cromossômicos do tipo fusão são comuns em vertebrados, já tendo sido detectados em vários grupos, sendo que na maioria dos casos, detectado sítios teloméricos intersticiais (Meyne et al. 2008), entretanto, não em outros (e.g. in *Imparfinis hollandi*, Margarido e Moreira-Filho 2008). A hibridização com sequência telomérica marcou as regiões terminais de todos os cromossomos do genoma, além de ter detectado um sítio intersticial no braço curto do par 1 metacêntrico próximo ao centrômero (Fig. 2b, 3). O ITS encontrado na população estudada é uma forte evidência de que um evento de fusão cromossômica esteja relacionado à diversificação de Auchenipteridae, mais especificamente em *Ageneiosus*. Esse par metacêntrico que sofreu fusão em *A. inermis* pode ser facilmente distinguido no cariótipo dessa espécie, pois seu tamanho é quase o dobro em relação aos outros cromossomos do complemento. Analisando os cariótipos disponíveis na literatura para outras espécies do gênero, como *A. atronasus* e *A. inermis* (Fenocchio e Bertollo 1992), e *A. brevis*, *A. inermis* e *A. ucayalensis* (Santos e Nakayama 2011), por exemplo, é também possível identificar um par cromossômico notavelmente maior do que os demais no cariótipo, o qual parece ser compartilhado entre as espécies de *Ageneiosus* anteriormente estudadas e a do presente trabalho.

Segundo Ribeiro (2011), as espécies pertencentes a esse gênero estão divididas em dois clados que contém, respectivamente, seis e treze espécies. Entre as espécies já estudadas cromossomicamente, *A. atronasus* e *A. brevis*, estão presentes no primeiro ramo (clado com seis espécies), enquanto, *A. inermis* e *A. ucayalensis* estão presentes no segundo ramo (clado com treze espécies). Essas informações provenientes da filogenia (mostrando que as espécies com estudos cromossômicos estão presentes nos dois grandes clados do gênero), somada às informações de que todas as espécies de *Ageneiosus* com dados cromossômicos até o momento

apresentam $2n$ inferior a 58, e contém esse grande cromossomo facilmente distinguível no cariótipo, nos fornece subsídios para propor que esse evidente evento de fusão em *A. inermis* entre dois pares acrocêntricos (Fig. 3), pode ser um rearranjo basal no gênero.

Há uma espécie de *Ageneiosus* presente em drenagens a oeste da cordilheira dos Andes, *A. pardalis*, a qual é endêmica de rios trans-andinos. A existência dessa espécie nessa região sugere que a origem do gênero *Ageneiosus* deve ter ocorrido antes da elevação da porção mais a norte dos Andes. Segundo Lundberg et al. (1998), os eventos geomorfológicos que teriam dado origem as essas bacias trans-andinas datam entre 8 e 11,8 milhões de anos atrás, e dessa forma, a análise cromossômica de exemplares dessa espécie poderia ser muito interessante para confirmar essa hipótese.

Segundo Slijepcevic (1998), há três possíveis eventos moleculares que possibilitariam a ocorrência de uma fusão cromossômica, como citado na introdução, entretanto somente uma inclui a manutenção estrutural da sequência telomérica (como observado neste trabalho pela detecção do ITS), que é a perda de função do telômero. Neste contexto, e segundo este último autor, há no mínimo três possíveis explicações para a perda de função do telômero, por exemplo: 1) perda de função das proteínas associadas ao telômero; 2) perda de função como resultado de mudanças na estrutura da cromatina (por exemplo, descondensação desta região); 3) inativação temporária do gene(s) da telomerase de células da linhagem germinativa. A investigação de qual seria a causa de tal rearranjo seria extremamente complexa; entretanto, é provável supor que a perda de função do telômero, independente de qual seja sua origem, seja a causa do rearranjo encontrado em *A. inermis*, uma vez que o ITS foi evidenciado.

Em suma, o genoma das espécies de *Ageneiosus* parece apresentar uma organização um pouco diferente quando comparada com outras espécies de Auchenipteridae, fato decorrente do padrão de heterocromatina, do rDNA 5S e do menor número diplóide. Tais fatores somados a evidência de fusão no par 1 e a condição derivada do gênero nas filogenias baseadas em dados morfológicos sugerem que os processos evolutivos cromossômicos em *Ageneiosus* difere do

restante da família, com evolução cromossômica mais conservada para os demais gêneros até o momento estudados. Além disso, fica a hipótese de que a evidência de fusão cromossômica na origem do par 1 em *A. inermis* possa ser um evento basal para o gênero.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares, ao técnico de laboratório Pedro Luis Gallo, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. (eds PA Backup, NA Menezes, MS Ghazzi), Série Livros 23. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 116-120.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Karyotype diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographical considerations. *Neotropical Ichthyology* 8: 361-368.
- Bueno V, Zawadzki CH, Margarido V (2012a). Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 241-250.

- Bueno V, Venere PC, Zawadzki CH, Margarido V (2012a). Karyotypic diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, Online First: DOI: 10.1007/s11160-012-9280-8.
- Eler ES, Dergam JA, Venere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira AA (2007) The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica* 130: 99-103.
- Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S (1982) Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 3798-3802.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype, C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios* 72: 19-22.
- Fenocchio AS, Dias AL, Margarido VP, Swarça AC (2008) Molecular cytogenetic characterization of *Glanidium ribeiroi* (Siluriformes) endemic to the Iguaçu river, Brazil. *Chromosome Science* 11: 61-66.
- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. (eds RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris Jr) Edipucrs, Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F (2011) Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research* 132: 64-70.

- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49: 810-813.
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9: 365-384.
- Giuliano-Caetano L (1998) Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 78 p.
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Holmquist GP, Dancis B (1979) Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4566-4570.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe [TTAGGG]_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Jones KW, Singh L (1985) Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends in Genetics* 1: 55-61.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lui, RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552-559.

- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry*, 87: 433-438.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerero J, Horton B, Malabarba MCSL, Wesselingh F (1998) The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical south american rivers. In: Malabarba L, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. Edipucrs, 13-48.
- Margarido VP, Moreira-Filho O (2008) Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 235-238.
- Martinez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Silva LF, Venere PC, Souza IL, Moreira-Filho O (2011) Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia* 64: 121-128.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133: 39-46.
- Mazzuchelli J, Swarça AC, Dias AL (2007) Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 Population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR. *Brazilian Journal of Biology* 67: 631–633.
- Mazzuchelli J, Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136: 461–469.

- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99: 3-10.
- Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr. JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2008) Cytogenetic studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarí and Xingú rivers, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31: 256-260.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934-2938.
- Pinna MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena). Edipucrs. Porto Alegre, 279-330.
- Ravedutti CG, Júlio Jr HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66: 65-70.
- Ribeiro FRV (2011) Sistemática do gênero *Ageneiosus* La Cépède (Siluriformes; Auchenipteridae). Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Ribeiro FRV, Py-Daniel LHR (2010) *Ageneiosus uranophthalmus*, a new species of auchenipterid catfish (Osteichthyes: Siluriformes) from river channels of the central Amazon basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 8: 97-104.
- Robertson WMRB (1916) Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Grillidae: chromosomes and variations. *J Morphol* 27: 179-331.

- Santos PA, Nakayama CM (2011) Diversidade cariotípica entre três espécies do gênero *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae) no lago do Catalão - Manaus, AM. XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, I: 62-66.
- Slijepcevic P (1998) Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- Srivastava J, Premi S, Kumar S, Ali S (2008) Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoal transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. *BMC Genomics* 9: 132.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, Martins C (2009) Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic Genome Research* 125: 224–234.
- Treco FR, Malabarba LR, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6: 87–92.
- Zakian VA (1997) Life and cancer without telomerase. *Cell* 91: 1-3.

Figuras

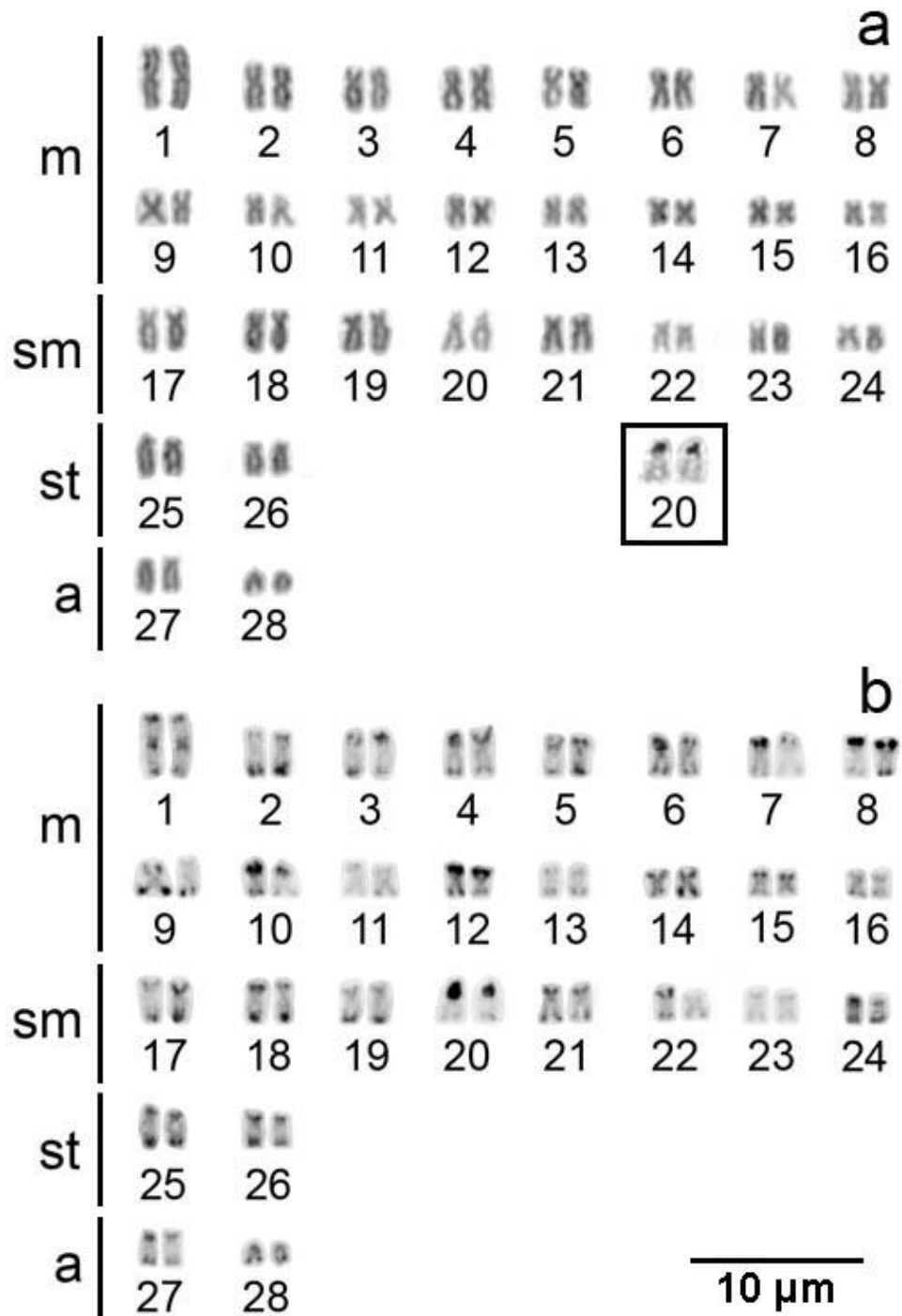


Figura 1 Cariótipo de *Ageneiosus inermis* corado com Giemsa e (b) sequencialmente C-bandado. Em destaque é apresentado o par cromossômico 20 impregnado pelo nitrato de prata.

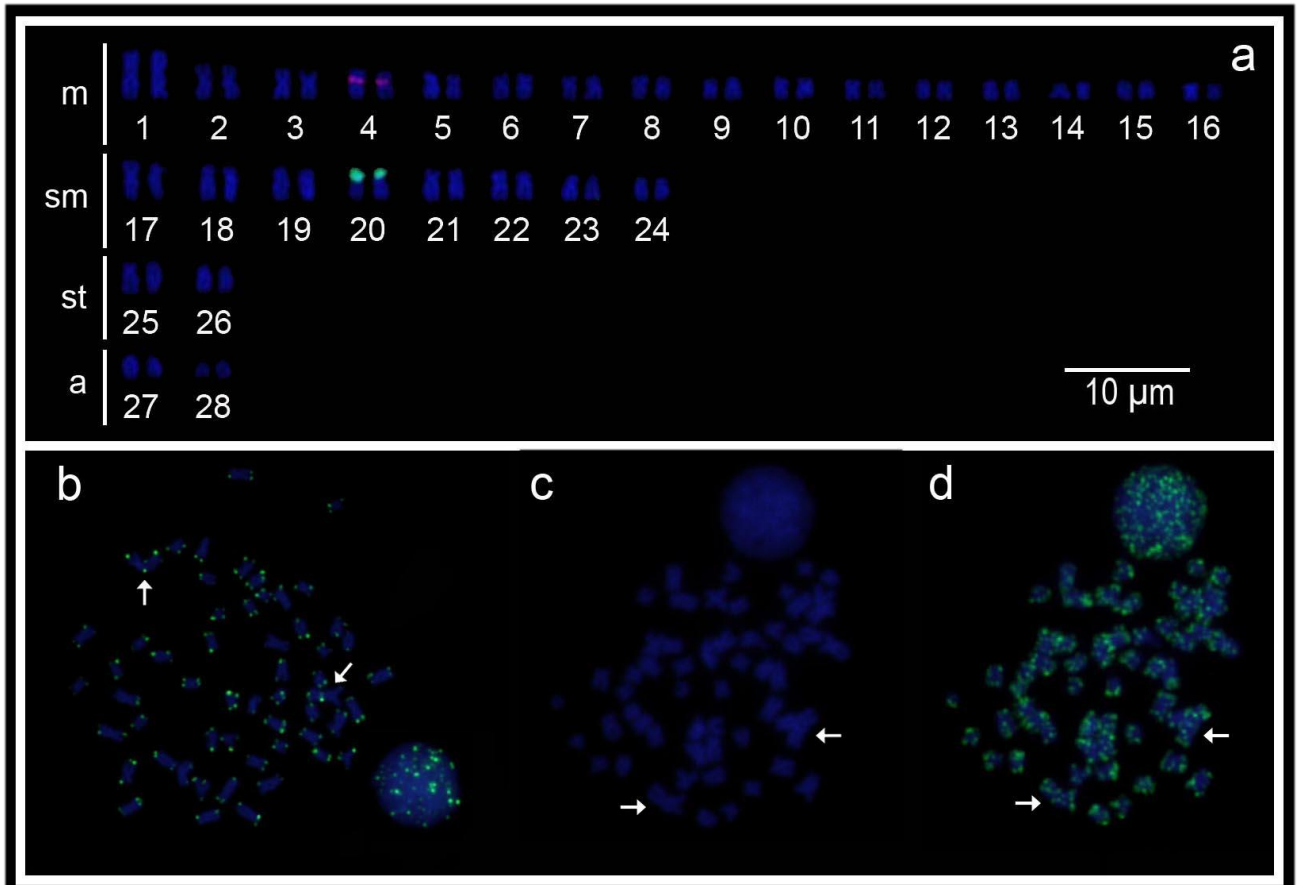


Figura 2 Cariótipo de *Ageneiosus inermis* hibridizado com (a) rDNA 5S (digoxigenina, vermelho) e 18S (FITC, verde). Metáfases de *Ageneiosus inermis* hibridizados com (b) sequência telomérica [TTAGGG]_n e (d) repetições [GATA]_n. As setas indicam o par cromossômico 1 metacêntrico fusionado.

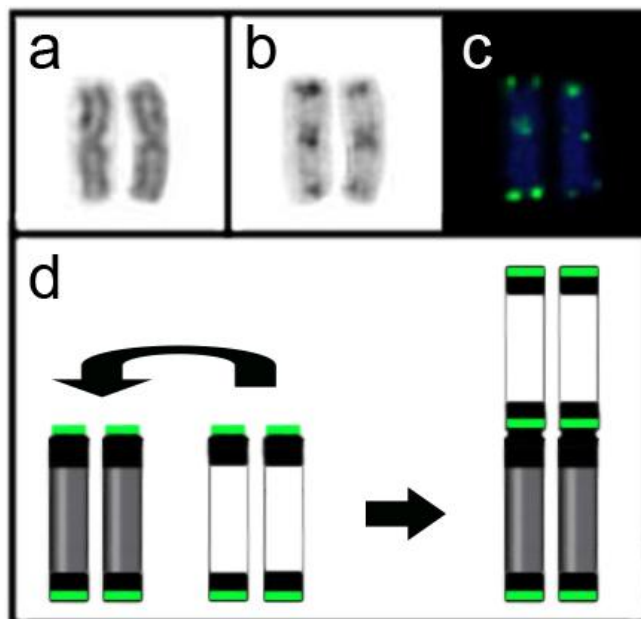


Figura 3 Par cromossômico 1 metacêntrico corado com Giemsa (a) C-bandado (b) e hibridizado com [TTAGGG]_n (c). Esquema em (d) representa o rearranjo de fusão que originou este par.

Capítulo II

Amplificação de sequência telomérica e ausência de elemento repetitivo sugerem origem comum entre cromossomos B em peixes (Siluriformes, Auchenipteridae)

Resumo

Os cromossomos B estão presentes em quase 15% das espécies de eucariotos, o que os torna importante no entendimento da evolução genômica. Esses cromossomos são estruturalmente conhecidos por acumular DNAs repetitivos de várias classes, como, satélites, ribossomais e elementos transponíveis. Este trabalho teve por objetivo descrever o segundo caso de cromossomos B em Auchenipteridae (*Trachelyopterus* sp.), e testar a hipótese de que os cromossomos B dessa espécie possam ter uma origem comum em relação aos cromossomos B de *Parauchenipterus galeatus*, uma vez que as duas espécies são filogeneticamente próximas. Ambas apresentaram 58 cromossomos no complemento A, heterocromatina localizada preferencialmente na região terminal da maioria dos cromossomos, Ag-NORs simples no braço curto de um par subtelocêntrico que foi confirmada pela hibridação com sonda de rDNA 18S, dois pares submetacêntricos portando rDNA 5S, e a presença de cromossomos B. Os cromossomos B das duas espécies são pequenos, metacêntricos, totalmente heterocromáticos, com variação intra e interindividual. Além disso, de forma intrigante e pela primeira vez em peixes, a sequência telomérica [TTAGGG]_n está amplificada nos cromossomos B de ambas as espécies. As repetições [GATA]_n estão espalhadas em todos os cromossomos do complemento A, entretanto, não foi observada nos cromossomos B, sendo este resultado também igual para as duas espécies. Todos esses marcadores reforçam a proximidade filogenética entre os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, e sugerem que os cromossomos B das duas espécies apresentam origem comum, anterior à diversificação desses gêneros.

Palavras-chave: Evolução cromossômica, [TTAGGG]_n, [GATA]_n, *Parauchenipterus galeatus*, *Trachelyopterus* sp.

Introdução

Cromossomos B estão presentes em cerca de 10% das espécies de eucariotos, o que os torna importante no entendimento da evolução genômica (Camacho 2005). Segundo Camacho (1993), os cromossomos B são considerados adicionais e dispensáveis, presentes em alguns indivíduos de algumas populações, e que devem se originar a partir dos cromossomos A, mas seguem sua própria evolução; dessa forma, os cromossomos B não constituem elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Os cromossomos B são totalmente, ou na sua maior parte, compostos por heterocromatina (Camacho 2000). Segundo Jones e Rees (1982), o termo cromossomo B deve ser empregado somente para os casos em que é apresentada sua frequência na população, representando uma característica intrínseca da mesma.

Esses cromossomos são estruturalmente conhecidos por apresentar acúmulo de DNAs repetitivos de várias classes, como satélites, ribossomais e elementos transponíveis, apesar de alguns genes de cópia simples já terem sido encontrados (Camacho 2005, Yoshida et al., 2011). Elementos transponíveis são considerados parasitas moleculares (Kidwell e Lisch 2001) e a comparação da composição de elementos transponíveis entre cromossomos A e B pode ser muito interessante devido às características que esses elementos apresentam. A presença desse tipo de sequência em cromossomos B sugere que elas estejam interagindo como parasitas de parasitas, uma vez que o modelo parasítico de manutenção de cromossomos B é o mais aceito atualmente (Camacho 2005); entretanto, em alguns casos, se aceita o modelo heterótico, o qual é documentado na literatura, como por exemplo, em *Allium schoenoprasum* (Plowman e Bougourd 1994).

Aproximadamente metade das espécies de peixes neotropicais que possuem cromossomos B são Characiformes e 35% são Siluriformes (Carvalho et al. 2008), sendo estes últimos representados por seis famílias: Auchenipteridae, Callichthyidae, Heptapteridae,

Pimelodidae, Trichomycteridae e Loricariidae (Carvalho et al. 2008; Lui et al. 2009). Auchenipteridae é constituída por bagres de pequeno a médio porte, endêmicos da região Neotropical, distribuídos em 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr 2007). Essa família é dividida em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae (Pinna 1998; Ferraris Jr 2003), sendo que é nesta última que estão taxonomicamente alocados *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*. Segundo Akama (2004), esses dois gêneros devem ser considerados como grupos-irmãos, além disso, após essa revisão apenas duas espécies passaram a ser válidas para *Trachelyopterus* (*T. coriaceus*, bacia do rio Araguaia; e *Trachelyopterus* sp., bacia Paraná-Paraguai). Em Auchenipteridae, as únicas duas espécies que apresentam cromossomos B são as apresentadas neste trabalho, *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp., sendo que para a primeira tal ocorrência já havia sido descrita anteriormente (Lui et al. 2009). As outras espécies de Auchenipteridae cromossomicamente estudadas até o momento não apresentam cromossomos B (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2010).

Este trabalho teve por objetivo descrever o segundo caso de cromossomos B em Auchenipteridae (*Trachelyopterus* sp.), e testar a hipótese de que os cromossomos B dessa espécie possam ter origem comum em relação aos cromossomos B de *Parauchenipterus galeatus*, uma vez que essas duas espécies são consideradas filogeneticamente próximas, com base em estudos morfológicos.

Materiais e Métodos

Foram analisados pelas técnicas de citogenética clássica e molecular 10 exemplares (7 fêmeas e 3 machos) de *Parauchenipterus galeatus* coletados em uma lagoa marginal localizada na margem direita do rio São Francisco no município de Lagoa da Prata, estado de Minas Gerais, Brasil (GPS 19°56'15.1"S; 45°32'13.8"O), e 6 exemplares (3 fêmeas e 3

machos) de *Trachelyopterus* sp. coletados na lagoa Arrombado, a qual é abastecida pelo rio Bento Gomes, um afluente do rio Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil (GPS 16°25'40.9"S; 56°25'07.4"O). Esses exemplares foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 100985 e MZUSP 110806).

A preparação da suspensão celular de cromossomos mitóticos foi obtida a partir de células do rim anterior (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1993). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão de distribuição de heterocromatina foi determinado através do método descrito por Sumner (1972) com modificações na etapa de coloração (Lui et al. 2012). As regiões organizadoras de nucléolos foram identificadas utilizando impregnação pelo nitrato de prata (Howell e Black 1980), sendo esta técnica aplicada em metáfases anteriormente coradas por Giemsa e C-bandadas (análise seqüencial).

As hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) foram realizadas segundo Pinkel et al. (1986). As sondas de rDNA 5S e rDNA 18S foram obtidas, respectivamente, segundo Martins et al. (2000) e Hatanaka e Galetti Jr (2004). Cada uma delas foi marcada por *nick translation*, com biotina-16-dUTP (rDNA 5S) e digoxigenina-11-dUTP (rDNA 18S) (Roche). As sequências dos elementos repetitivos, [TTAGGG]_n e [GATA]_n foram obtidas por Polimerase Chain Reaction - PCR (Ijdo et al. 1991) sem DNA molde e a marcação foi realizada na reação de PCR com dUTP-16-biotina (Roche). As hibridizações foram realizadas sob alta condição de estringência – 77% (200ng de cada sonda, 50% de formamida deionizada, 10% de sulfata de dextrano, 2xSSC pH 7.0, a 37°C, overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em solução de 15% formamida/0,2xSSC a 42°C por

20 minutos. A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando avidina-FITC e anti-avidina/biotina (Sigma) para as sondas marcadas com biotina e anti-digoxigenina/rodamina para as sondas marcadas com digoxigenina. Os cromossomos foram contra-corados com solução de antifading/DAPI (20 µL de antifading + 0,1 µL de DAPI – 0,2mg/ml) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software DP2-BSW (Olympus).

Resultados

Parauchenipterus galeatus

O número diplóide encontrado para a espécie estudada foi de 58 cromossomos (22m + 16sm + 12st + 8a, NF=108), não sendo encontradas diferenças entre os sexos (Fig. 1a). Dos dez exemplares analisados, sete (dois machos e cinco fêmeas) apresentaram cromossomos B de tamanho pequeno e do tipo metacêntrico. Seis exemplares apresentaram variação de até 2 B e um macho apresentou até 1 B (Tab. 1). Entre os exemplares com B, a frequência de células portando cromossomo B variou de 55% a 86%, dependendo do exemplar (Tab. 1). O bandamento C demonstrou que a heterocromatina está localizada em posição terminal de quase todos os cromossomos do complemento A (Fig. 1b). Os cromossomos B mostraram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 1, em destaque). A impregnação com o nitrato de prata evidenciou RONS simples em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 23 (Fig. 1, em destaque). A hibridização com sonda de rDNA 18S também evidenciou um único par cromossômico portador destes sítios, correspondente ao evidenciado pela Ag-RON (Fig. 2a). A sonda de rDNA 5S mostrou que o sítio está localizado em posição intersticial no braço curto do par submetacêntrico 16 e no braço longo do par submetacêntrico 17 (Fig. 2a). A hibridização com sonda telomérica [TTAGGG]_n evidenciou marcação na região terminal de todos os cromossomos do complemento A conforme esperado, além de estar amplificada e

dispersa ao longo dos cromossomos B (Fig. 3b). A FISH com a sonda de repetições [GATA]_n mostrou que esta sequência está presente na maioria dos cromossomos do complemento A na região terminal, entretanto, nenhum sinal foi detectado nos cromossomos B (Fig. 3d).

Trachelyopterus sp.

O número diplóide encontrado para a espécie estudada foi de 58 cromossomos (22m + 20sm + 8st + 8a, NF=108) para ambos os sexos (Fig. 1c). Dos seis exemplares analisados, duas fêmeas apresentaram cromossomos B de tamanho pequeno e do tipo metacêntrico. Um dos exemplares apresentou até 2 B e o outro apresentou até 3 B. A frequência de células com cromossomos B variou de 50% a 68%, dependendo do exemplar (Tab. 1). O bandamento C demonstrou que a heterocromatina está dispersa em posição terminal de quase todos os cromossomos do complemento A (Fig. 1d). Os cromossomos B mostraram-se totalmente heterocromáticos (Fig. 1, em destaque). A impregnação com o nitrato de prata evidenciou RONS simples em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 22 (Fig. 1, em destaque). A hibridização com sonda de rDNA 18S confirmou o resultado anteriormente encontrado pela Ag-RON (Fig. 2b). A sonda de rDNA 5S mostrou que este sítio está localizado em posição intersticial no braço curto do par submetacêntrico 16 e no braço longo do par submetacêntrico 18 (Fig. 2b). A hibridação com sequência [TTAGGG]_n evidenciou a região terminal de todos os cromossomos do complemento A conforme esperado, além de estar amplificada e dispersa ao longo dos cromossomos B (Fig. 3f). A hibridação com a sonda de repetições [GATA]_n mostrou que esta sequência está presente na maioria dos cromossomos do complemento A na região terminal, coincidente com as regiões heterocromáticas, entretanto, nenhum sinal foi detectado nos cromossomos B (Fig. 3h).

Tabela 1 Frequência de cromossomos B em *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp.

	Exemplar	Sexo	Número de Metáfases				Células com B (%)	Total
			0 B	1 B	2 B	3 B		
<i>Parauchenipterus galeatus</i> - Bacia do rio São Francisco	1	♀	12	10	13	-	65,7	35
	2	♀	33	-	-	-	-	33
	3	♀	08	05	05	-	55,5	18
	4	♂	28	30	15	-	61,6	73
	5	♀	02	03	01	-	66,7	06
	6	♀	09	10	02	-	57,1	21
	7	♂	04	05	-	-	55,5	09
	8	♀	08	19	31	-	86,2	58
	9	♂	11	-	-	-	-	11
	10	♀	28	-	-	-	-	28
	Total		143	82	67	-	68%*	292
<i>Trachelyopterus</i> sp. - Bacia do rio Paraguai	1	♀	02	-	-	-	-	02
	2	♀	17	30	06	-	68	53
	3	♂	09	-	-	-	-	09
	4	♂	11	-	-	-	-	11
	5	♀	15	07	03	05	50	30
	6	♂	11	-	-	-	-	11
	Total		65	37	09	05	61%*	116

*A frequência total de células está considerando somente os exemplares portadores de cromossomos B.

Discussão

Os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus* são considerados grupo-irmão, fato que é fortemente reforçado pela problemática taxonômica que envolve o grupo (Akama 2004). Isto pode explicar a grande similaridade entre marcadores cromossômicos dessas duas espécies. Entretanto, essa situação com pouca variação não é exclusivas dessas espécies, uma vez que muitos grupos de bagres neotropicais apresentam um relativo conservadorismo cariotípico. Os poucos estudos cromossômicos em Auchenipteridae (e.g., Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010) reforçam essa hipótese de conservadorismo, sendo que a maioria das diferenças são normalmente atribuídas a rearranjos não-robertsonianos (Lui et al. 2010). As características aqui analisadas para *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp., corroboram esse conservadorismo cromossômico com manutenção do número diplóide ($2n = 58$), Ag-RONs simples em posição terminal no braço curto de um par subtelocêntrico (confirmado pela FISH com rDNA 18S), heterocromatina dispersa na região terminal da maioria dos cromossomos do complemento, dois pares portadores do rDNA 5S, e similaridade entre os cromossomos B presentes nas duas espécies.

Segundo Ravedutti e Júlio Jr (2001), RONS simples em posição intersticial pode ser uma característica de Auchenipteridae. Nas duas espécies analisadas neste trabalho, as RONS apresentaram-se simples em posição terminal de pares cromossômicos subtelocêntricos. Em todas as espécies de Auchenipteridae analisadas até o momento, este marcador ocorre em apenas um par cromossômico, entretanto, a sua localização intersticial ou terminal varia, sendo que em populações de *P. galeatus* está sempre em posição terminal. Esta é a primeira análise cromossômica de uma espécie de *Trachelyopterus* e os dados mostram grande semelhança com *Parauchenipterus*, reforçando a proximidade filogenética dos gêneros. Uma pequena diferença em relação a este marcador pode ser observada, com as RONS em *P. galeatus* sendo coincidente a uma região de heterocromatina, enquanto em *Trachelyopterus* sp. as RONS foram banda-C negativa.

De maneira geral, o padrão de bandamento C foi muito similar nas duas espécies, com blocos pálidos localizados na região terminal da maioria dos cromossomos. Padrão similar de banda C ocorre em outros Auchenipteridae como *Ageneiosus inermis*, *Ageneiosus atronatus*, *Auchenipterus nuchalis*, *Glanidium ribeiroi* e *Parauchenipterus galeatus* (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010), sugerindo ser esta uma característica comum a família. Os cromossomos B das duas espécies analisadas mostraram-se totalmente heterocromáticos como na maioria das espécies de peixes neotropicais que apresentam esse tipo de cromossomo.

Por outro lado, um elemento repetitivo, a sequência telomérica $[\text{TTAGGG}]_n$, foi detectado nos cromossomos B das duas espécies. É possível encontrar na literatura cromossomos B portando sequência telomérica intersticial, como por exemplo, no guaxinim *Nyctereutes procyonides* (Wurster-Hill et al. 1988) e no rato *Nectomys squamipes* (Silva e Yonenaga-Yassuda 1998). Entretanto, este é o primeiro caso em peixes onde, de modo singular, a presença de sequências teloméricas em cromossomos B ocorre nas únicas duas espécies da família Auchenipteridae. Além disso, essa sequência não se mostrou em posição intersticial como em trabalhos anteriores (e.g., Wurster-Hill et al. 1988; Silva e Yonenaga-Yassuda 1998), mas dispersa ao longo de todo o cromossomo B (Fig. 3b, f). A presença de elementos repetitivos dispersos em cromossomos B é comum, entretanto, não há relatos do mesmo padrão para sequência telomérica. Após o surgimento de um cromossomo B é frequente a sua posterior degeneração através do acúmulo de DNA repetitivo (Camacho 2005), o que nessas espécies parece ter ocorrido com a participação de sequências teloméricas.

Dois possíveis hipóteses emergem para explicar a presença de sequências teloméricas dispersas nos cromossomos B: i) esses cromossomos B podem ter se originado por um processo de quebra cromossômica envolvendo a região terminal de um cromossomo do complemento A, ou ii) essa sequência foi posteriormente amplificada nesses cromossomos após o evento de origem. Essa segunda hipótese parece ser mais plausível devido ao fato desses cromossomos B

apresentarem morfologia definida, a qual é metacêntrica, apesar do pequeno tamanho. A morfologia da maioria dos cromossomos B descritos em peixes neotropicais é metacêntrica (Salvador e Moreira-Filho 1992; Carvalho et al. 2008), o que reforça o modelo de origem por isocromossomo.

As repetições [GATA]_n, as quais foram inicialmente descobertas por Epplen et al. (1982), estão conservadas em diferentes espécies, incluindo humanos (Srivastava et al. 2008), além de parecer estar associada à determinação e evolução de cromossomos sexuais em grupos de cobras (Jones e Singh 1985), e de estágios iniciais relacionados a origem de cromossomos sexuais em poecilídeos (Nanda et al. 1992). Segundo Subramanian et al. (2003), esta sequência parece estar relacionada a diversas funções no genoma humano, sendo que, além da possível relação com a determinação do sexo acredita-se que esteja relacionada com regulação gênica. No presente trabalho, as repetições [GATA]_n foram localizadas na região terminal de todos os cromossomos do complemento A (Fig. 3 d, h), entretanto os cromossomos B não apresentaram sinal de hibridação. Além disso, a sequência [GATA]_n foi coincidente com os blocos de heterocromatina nas duas espécies, e a princípio, é possível que essas repetições sejam parte estruturalmente integrante dessas regiões podendo ter alguma função regulatória no genoma. Apesar da ausência de sinais de hibridização das repetições [GATA]_n nos cromossomos B, não pode ser descartada a hipótese de que essas repetições possam estar presentes em um baixo número de cópias, as quais não seriam detectáveis por FISH.

As repetições [GATA]_n mostram no mínimo uma organização diferente nos cromossomos B quando comparados com o complemento A, o que sugere que logo após a possível origem do cromossomo B na base do grupo formado por *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, deve ter ocorrido um processo de diminuição da sequência [GATA]_n no B. Mecanismos de origem, proliferação e posterior eliminação são conhecidos como birth-and-death, e parecem ser uma característica inerente da evolução de diferentes classes de elementos repetitivos, como DNA satélites e elementos transponíveis (Beredze 1939). Essa eliminação

talvez tenha ocorrido somente no B devido à menor pressão de seleção que normalmente sofrem esse tipo de cromossomo. A ausência dessas seqüências no B das duas espécies sugere que essa configuração tenha se mantido conservada desde a origem desses cromossomos.

Segundo Camacho et al. (2000), o número máximo de cromossomos B em uma população é o resultado das interações entre o sistema de acúmulo (aumento da frequência) e os efeitos prejudiciais que esses cromossomos podem gerar aos portadores. Em quase 40% dos casos em peixes neotropicais foi encontrado apenas 1 cromossomo B por indivíduo (Carvalho et al. 2008). Entretanto, Erdtmann et al. (1990) mostram que em *Callichthys callichthys* este número pode chegar a 16, e valores significativamente maiores podem ser encontrados em outros organismos. Apesar do número máximo de cromossomos B em *P. galeatus* e *Trachelyopterus* sp. ter sido diferente, sendo dois e três, respectivamente, as duas populações apresentaram frequências de células com B nos exemplares portadores maior do que 50%, variando em *P. galeatus* de 55% a 86%, e em *Trachelyopterus* sp. de 50% a 68%. A variação inter- e intraindividual da frequência de cromossomos B nas duas espécies reflete instabilidade mitótica, provavelmente em decorrência de comportamento não Mendeliano durante a divisão celular, conforme proposto originalmente por Jones & Rees (1982).

Segundo Camacho (2005), os cromossomos B podem apresentar vida longa e a melhor evidência disso seria a presença de cromossomos B similares em espécies proximalmente relacionadas, como no caso das espécies deste trabalho. Os dados apresentados sugerem que estes cromossomos B possuem origem comum e que devem ter permanecido após os processos de especiação relacionados ao clado (*Parauchenipterus* + *Trachelyopterus*). Em peixes, o grande cromossomo B metacêntrico já documentado em algumas espécies do gênero *Astyanax* parece ser um nítido caso de origem comum (Moreira-Filho et al. 2001). Um caso semelhante de origem comum é documentado em centeio, entre *Secale cereale* e *S. vegetale*, em que os cromossomos B das duas espécies apresentam pareamento meiótico em híbridos interespecíficos (Niwa e Sakamoto 1995). Segundo Camacho (2005), este caso das espécies de centeio necessitaria de

maiores estudos para confirmar a ancestralidade, especificamente em relação ao conteúdo de DNA desses cromossomos B. Os cromossomos B de Auchenipteridae também parecem suportar esta hipótese de origem comum devido ao mapeamento com elementos repetitivos [TTAGGG]_n e [GATA]_n e a proximidade filogenética das espécies.

De maneira geral, se pode observar que as duas espécies apresentadas neste trabalho possuem uma constituição cromossômica muito semelhante no número diplóide, fórmula cariotípica, distribuição de regiões heterocromáticas, rDNA 18S, rDNA 5S e presença de cromossomos B, os quais apresentam amplificação de [TTAGGG]_n e ausência de repetições [GATA]_n. Todos esses aspectos confirmam a grande proximidade filogenética entre *P. galeatus* e *Trachelyopterus* sp., além disso, reforçam a hipótese de que os cromossomos B presentes nessas duas espécies apresentam origem comum, anterior a diversificação desse grupo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares, aos técnicos de coleta Luis Henrique da Silva e Pedro Luis Gallo, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

Akama A (2004) *Sistemática dos gêneros Parauchenipterus Bleeker, 1862 e Trachelyopterus Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 375p.

- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (eds) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, 116-120.
- Beredze T (1939) Satellite DNA. Library of Congress Cataloging in Publication Data, 149p.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120.
- Camacho JPM (1993) Polymorphisms and geographic distribution. *Proceedings of the First B Chromosome Conference*, Madrid, Espanha, 2-4.
- Camacho JPM (2005) B Chromosomes. In: *The Evolution of the Genome* (ed Gregory TR). Elsevier Academic Press, 223-286.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 55: 163–178.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 72: 1907-1932.
- Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S (1982) Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 3798-3802.
- Erdtmann B, Clacagnoto D, Rabolini L, Malabarba LR (1990) Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, Pisces). *Ciência e Cultura* 42, 452.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype, C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios* 72: 19-22.
- Fenocchio AS, Dias AL, Margarido VP, Swarça AC (2008) Molecular cytogenetic characterization of *Glanidium ribeiroi* (Siluriformes) endemic to the Iguçu river, Brazil. *Chromosome Science* 11: 61-66.

- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ (eds) Check List of Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79: 107–114.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49: 810-813.
- Green DM (1990) Muller's Ratched and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33: 818-824.
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Jones RN, Rees H (1982) B chromosomes. Academic Press, London.
- Jones KW, Singh L (1985) Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends in Genetics* 1: 55-61.
- Kidwell MG, Lisch DR (2001) Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55: 1-24.

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552-559.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133:39-46.
- Moraes VPO, Cerali SS, Froehlich O, Dias AL (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 6: 627-633.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 66: 59-64.
- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, Eppelen JT, Schmid M (1992) Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* 101: 301-310.
- Niwa K, Sakamoto S (1995) Origin of B-chromosomes in cultivated rye. *Genome* 38: 307-312.

- Oliveira C, Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76: 183–186.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934-2938.
- Pinna MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds) Phylogeny and classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre, 279-330.
- Plowman AB, Bougourd SM (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72: 587-593.
- Ravedutti CG, Júlio Jr HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66: 65-70.
- Salvador LB, Moreira-Filho O (1992) B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69: 50–56.
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Research* 6: 455-462.
- Srivastava J, Premi S, Kumar S, Ali S (2008) Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoal transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. *BMC Genomics* 9: 132.
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of *Bkm* sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681-685.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin.

Experimental Cell Research 75: 304-306.

Venere PC, Miyazawa CS, Galetti Jr PM (1999) New Cases of Supernumerary Chromosomes in

Characiform Fishes. *Genetics and Molecular Biology* 22: 345-349.

Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the

family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science* 3: 9–13.

Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, et al. (2011) B Chromosomes Have a

Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS*

Genetics 7: e1002203.

Wurster-Hill DH, Ward OG, Davis BH, Park JP, Moyzis RK, Meyne J (1988) Fragile sites,

telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes*

procyonoides, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. *Cytogenetics and*

Cell Genetics 49: 278-281.

Figuras

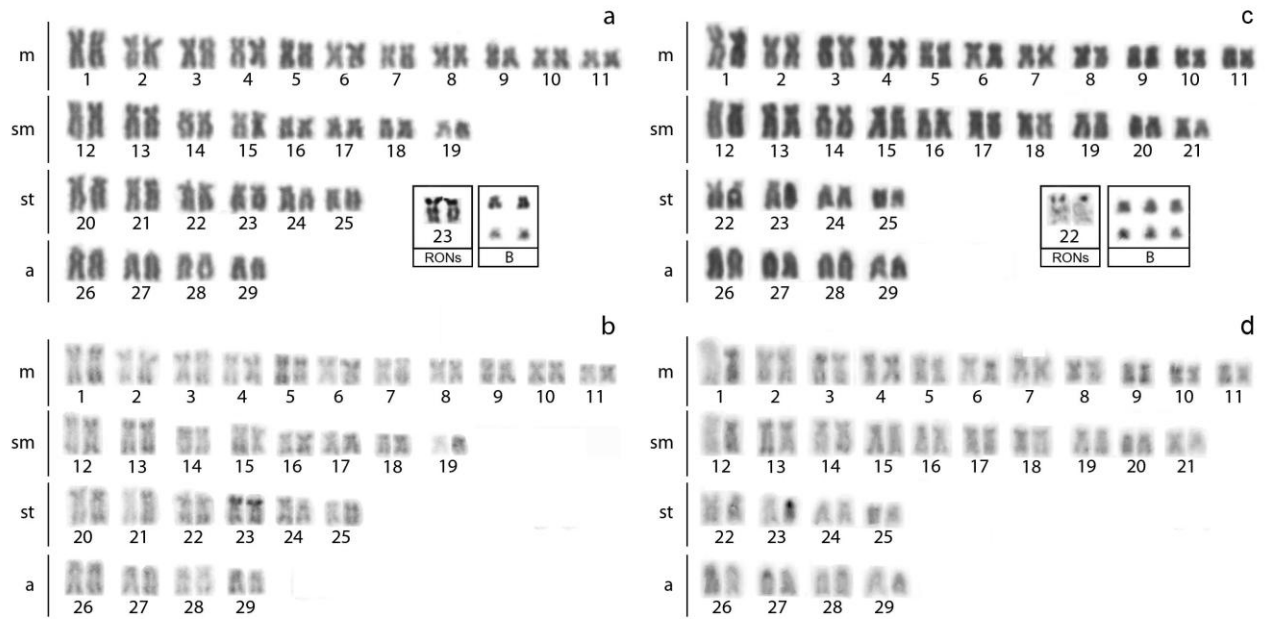


Figura 1 Cariótipos de *Parauchenipterus galeatus* (a, b) e *Trachelyopterus* sp. (c, d) corados com Giemsa (a, c) e sequencialmente C-bandados (b, d). Em destaque estão os cromossomos B das duas espécies corados com Giemsa e sequencialmente C-bandados, e os pares subtlocêntricos 23 e 22 portadores das RONS de *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp., respectivamente.

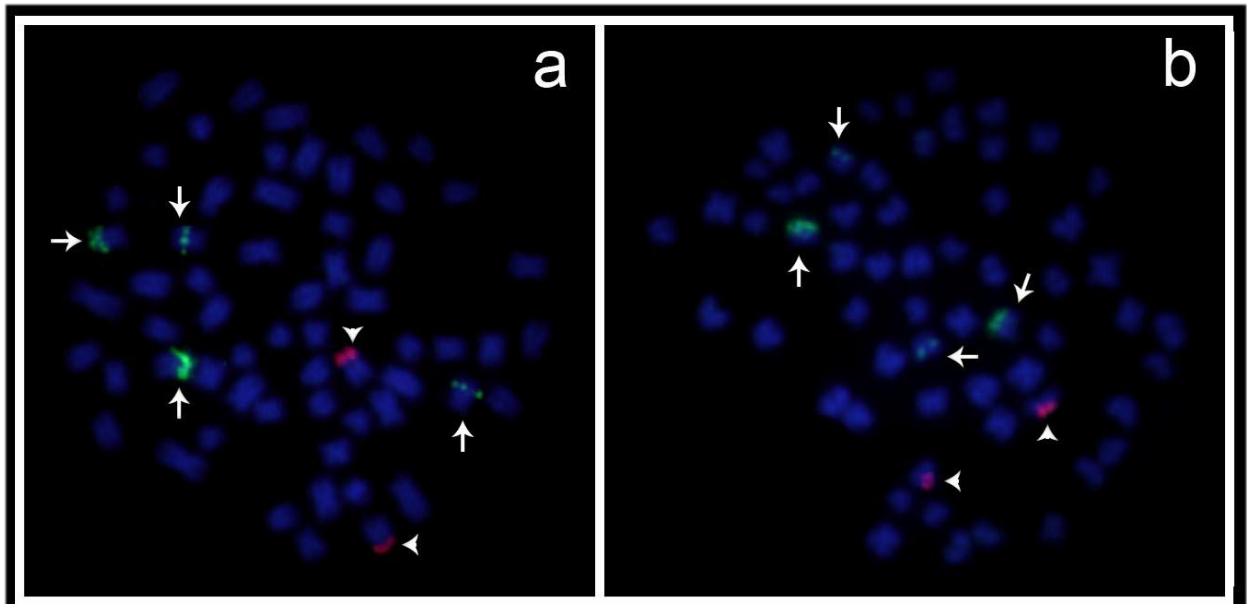


Figura 2 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp. hibridizadas com rDNA 5S (FITC – verde) e 18S (digoxigenina – vermelho). As setas indicam os cromossomos portadores do rDNA 5S e as cabeças de seta o rDNA 18S.

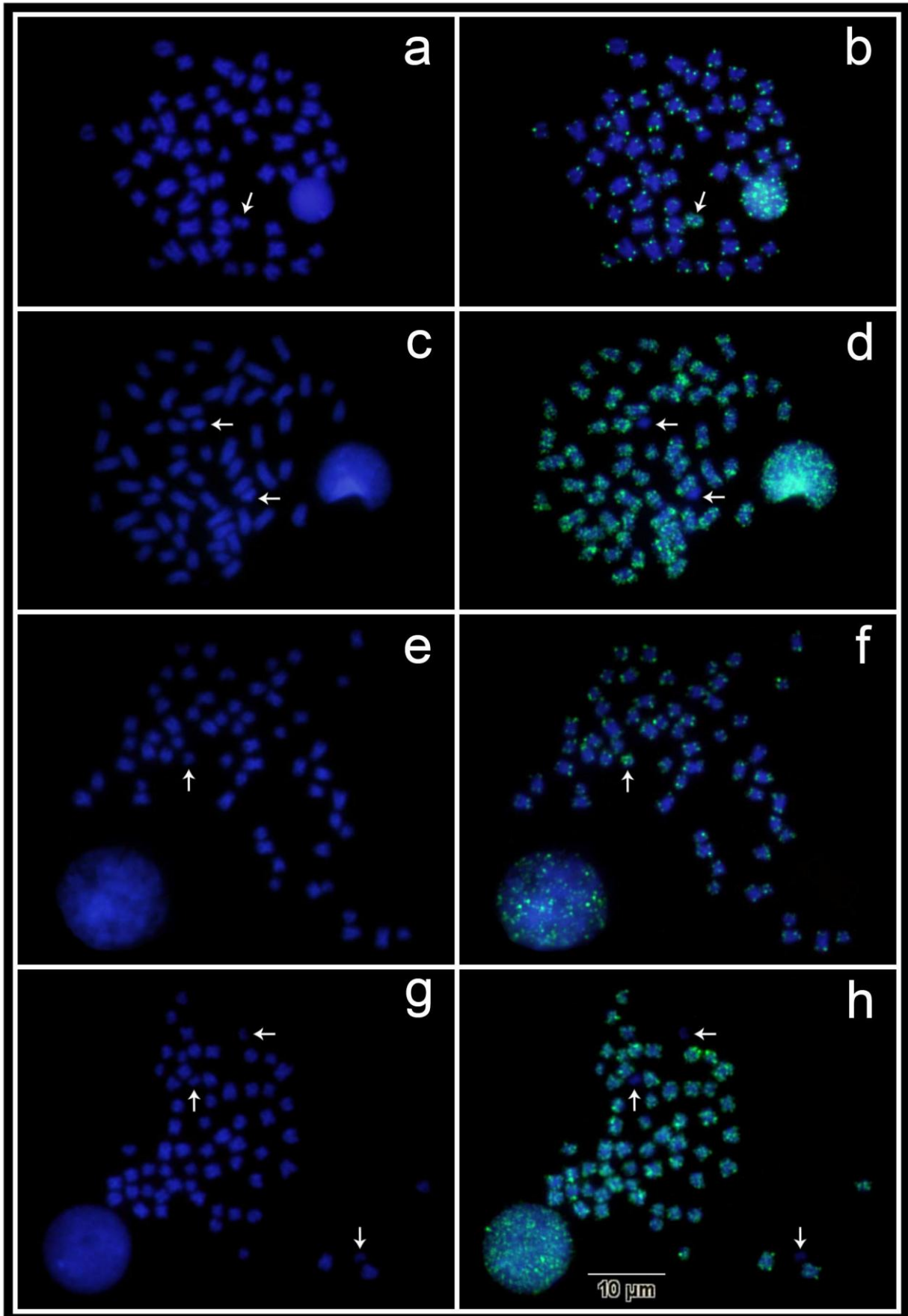


Figura 3 Metáfases de *Parauchenipterus galeatus* (a, b, c, d) e *Trachelyopterus* sp. (e, f, g, h) coradas com DAPI (a, c, e, g) e hibridizadas com sonda de sequência telomérica $[TTAGGG]_n$ (b, f) e sequência $[GATA]_n$ (d, h). As setas indicam os cromossomos B.

Capítulo III

Análise cromossômica comparativa e considerações evolutivas sobre duas espécies do gênero *Tatia* (Siluriformes, Auchenipteridae)

Este trabalho está aceito na Revista Comparative Cytogenetics.

Resumo

Auchenipteridae é dividida em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae apresenta 31 espécies válidas, sendo 13 referentes ao gênero *Tatia*. Destas, *T. jaracatia* e *T. neivai* representam as únicas duas espécies da drenagem Paraná-Paraguai. Este trabalho teve por objetivo analisar cromossomicamente as espécies *T. neivai* e *T. jaracatia*, e assim gerar os primeiros dados cromossômicos para o gênero. Ambas apresentaram $2n=58$ cromossomos com diferenças na fórmula cariotípica. A heterocromatina se mostrou distribuída na região centromérica e terminal da maioria dos cromossomos de *T. jaracatia*, e na região terminal da maioria dos cromossomos de *T. neivai*. As Ag-RONs se mostraram presentes no par subtelocêntrico 28 para as duas espécies, o que foi confirmado pela FISH com rDNA 18S. O rDNA 5S foi detectado em 4 pares cromossômicos em *T. jaracatia* e 3 pares cromossômicos em *T. neivai*. As duas espécies de *Tatia* apresentaram grande semelhança cromossômica, entretanto, quando comparadas com as outras espécies de Auchenipteridae, é possível identificar algumas diferenças na fórmula cariotípica, no padrão de heterocromatina e na distribuição do rDNA 5S, que até então, parecem ser intrínsecas do gênero *Tatia*.

Introdução

Entre os Siluriformes, Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical. Esta família está distribuída em 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr 2007), sendo que 74 destas já foram registradas em território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares 2007). Segundo Ferraris Jr (2003), Auchenipteridae é dividida em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae, as quais formam grupos monofiléticos (Birindelli 2010). A maioria dos gêneros de Auchenipteridae pertence à subfamília Auchenipterinae, sendo que apenas *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Tatia* e *Glanidium* estão alocados em Centromochlinae (Soares-Porto 1998). A subfamília Centromochlinae possui 31 espécies válidas (Ferraris Jr 2007), sendo que em revisão do gênero, *Tatia* passou a abranger 12 espécies (Sarmiento-Soares e Martins-Pinheiro 2008). Posteriormente a essa revisão, uma nova espécie desse gênero foi descrita, a qual é endêmica do rio Iguazu (tributário da bacia do Paraná), *Tatia jaracatia* (Pavanelli e Bifi 2009).

O gênero *Tatia* está presente na região leste dos Andes com ampla distribuição nas drenagens sul-americanas (Sarmiento-Soares e Martins-Pinheiro 2008). De maneira geral, os peixes desse grupo são encontrados em ambientes lênticos de igarapés, rios e lagos e possuem hábito noturno (Lowe-McConnell 1987). A maioria das espécies pode ser encontrada em rios pertencentes à bacia Amazônica (Sarmiento-Soares e Martins-Pinheiro 2008). As espécies estudadas neste trabalho (*T. neivai* e *T. jaracatia*) representam as únicas duas espécies da bacia do Paraná-Paraguai pertencentes ao gênero *Tatia*, sendo que *T. neivai* se apresenta amplamente distribuída entre as bacias do Paraná e do Paraguai, mas ausente da bacia do rio Iguazu.

As análises cromossômicas em Auchenipteridae são escassas e estão restritas a poucas espécies dos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus*. As duas espécies de *Ageneiosus* possuem número diplóide igual a 56 cromossomos (Fenocchio e Bertollo 1992), enquanto as outras espécies (*Glanidium ribeiroi*, *Parauchenipterus galeatus*, e *Auchenipterus osteomystax*, citado como *A. nuchalis*) possuem 58 cromossomos (Fenocchio e

Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010). Até o momento, não existem estudos cromossômicos em espécies do gênero *Tatia*. Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar cromossomicamente as únicas duas espécies da drenagem do Paraná-Paraguai pertencentes ao gênero *Tatia*, *T. neivai* e *T. jaracatia*, e assim, gerar os primeiros dados cromossômicos referentes ao gênero.

Materiais e Métodos

Foi realizada análise cromossômica em 17 exemplares (15 machos e 2 fêmeas) de *Tatia neivai* da bacia do rio Machado, um afluente do rio Bugres, bacia do rio Paraguai, do município de Denise (MT) (14°40'43.2''S; 57°00'47.0''W), e 10 exemplares (7 machos e 3 fêmeas) de *Tatia jaracatia* da bacia do rio Iguazu, município de Capanema (PR) (25°35'19.6''S; 53°54'48.2''W). Os exemplares foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (*T. jaracatia*, MZUSP 109792; *T. neivai*, MZUSP 109794).

A preparação das suspensões celulares de cromossomos mitóticos foi obtida de células do rim anterior (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1993). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão heterocromático foi determinado através de Sumner (1972) com modificações de Lui et al. (2012) e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram identificadas utilizando impregnação pelo nitrato de Prata (Howell e Black 1980). Ambos bandamentos foram efetuados sequencialmente, após a coloração convencional dos cromossomos por Giemsa (análise seqüencial).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel et al. (1986). As sondas rDNA 18S e 5S foram obtidas segundo Hatanaka e Galetti Jr (2004) e por Martins et al. (2000), respectivamente. Cada uma delas foi marcada por nick translation, respectivamente, com

biotina-16-dUTP e digoxigenina-11-dUTP (Roche). A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando avidina-FITC e anti-avidina biotina (Sigma) para as sondas marcadas com biotina e anti-digoxigenina rodamina (Roche) para as sondas marcadas com digoxigenina. Os cromossomos foram contracorados com solução de DAPI e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software DP2-BSW (Olympus).

Resultados

Tatia jaracatia

O número diplóide encontrado foi igual a 58 cromossomos (20m + 26sm + 12st, NF=116) (Fig. 1a). A heterocromatina se mostrou dispersa na região centromérica e terminal da maioria dos cromossomos do cariótipo (Fig. 1b). A impregnação pelo nitrato de prata revelou somente o par subtelocêntrico 28 marcado no braço curto em posição terminal (Fig. 1a, em destaque). A hibridização com a sonda de rDNA 18S mostrou apenas um par cromossômico marcado (par 28), correspondente com a impregnação pelo nitrato de prata. O rDNA 5S foi detectado em 4 pares cromossômicos (pares 4, 18, 19 e 29), estando no braço curto em posição intersticial do par 4 (metacêntrico), no braço curto em posição terminal dos pares 18 (submetacêntrico) e 29 (subtelocêntrico), e no braço longo em posição intersticial do par 19 (submetacêntrico) (Fig. 2).

Tatia neivai

O número diplóide encontrado foi igual a 58 cromossomos (26m + 26sm + 6st, NF=116) (Fig. 1c). A heterocromatina se mostrou fracamente marcada e dispersa na região terminal da maioria dos cromossomos do cariótipo, com exceção de dois blocos mais conspícuos: um em posição intersticial no braço longo do par submetacêntrico 15, e outro em posição terminal no braço curto do par subtelocêntrico 28 (Fig. 1d), o qual é correspondente às NORs (Fig. 1c, em

destaque). A hibridação com a sonda de rDNA 18S mostrou apenas o par subtelocêntrico 28 marcado, correspondente com a impregnação pelo nitrato de prata. O rDNA 5S foi detectado em 3 pares cromossômicos (pares 4, 21, 22), estando no braço curto em posição intersticial do par 4 (metacêntrico), no braço curto em posição terminal do par 21 (submetacêntrico), e no braço longo em posição intersticial do par 22 (submetacêntrico) (Fig. 2).

Discussão

Os estudos cromossômicos em Auchenipteridae vêm mostrando que a maioria das espécies analisadas possui número diplóide igual a 58 (Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010), com exceção das espécies do gênero *Ageneiosus* com 56 cromossomos (Fenocchio e Bertollo 1992). O gênero *Tatia* está incluído na subfamília Centromochlinae, a qual possui apenas uma espécie com análise cromossômica até o momento, *Glanidium ribeiroi*, também com $2n = 58$ cromossomos, assim como as duas espécies de *Tatia* analisadas no presente trabalho. O $2n=58$ é compartilhado pelas espécies dos gêneros *Auchenipterus* e *Parauchenipterus* (subfamília Auchenipterinae), e por 14 das 16 espécies já analisadas da família Doradidae (Eler et al. 2007; Milhomem et al. 2008), a qual é considerada grupo-irmão de Auchenipteridae (Pinna 1998). Desta forma, é provável que $2n=58$ cromossomos seja basal, não só em Auchenipteridae, mas também em Centromochlinae. Esta proposição é reforçada pelo fato do número diplóide igual a 58 ser considerado basal para Doradidae (Milhomem et al. 2008).

O mesmo número fundamental (NF=116) encontrado nas duas espécies de *Tatia* deste trabalho é maior do que o encontrado nas demais espécies de Auchenipteridae até então estudadas. Essa diferença é decorrente de um acréscimo na quantidade de cromossomos portadores de dois braços, em detrimento dos cromossomos portadores de apenas um braço (Fig. 1a, c). Essa ausência de cromossomos acrocêntricos ainda não havia sido detectada nas demais espécies da família, o que parece ser uma característica intrínseca do gênero *Tatia*, ou pelo

menos de um clado específico formado pelas espécies ora estudadas. Desta forma, considerando a manutenção do número diploide, e a variação na fórmula cariotípica e NF das espécies analisadas quando comparadas com as demais espécies de outros gêneros de Auchenipteridae, fica evidente que rearranjos não-Robertsonianos, aqui representados por inversões pericêntricas/translocações, devem ser mecanismos atuantes na diversificação cariotípica das espécies do gênero *Tatia*.

O padrão de distribuição de heterocromatina encontrado em *T. jaracatia* e *T. neivai* difere em alguns aspectos das demais espécies de Auchenipteridae. Além dos blocos heterocromáticos na região terminal dos cromossomos, que são comumente encontrados na maioria das espécies de Auchenipteridae, foi observada heterocromatina na região centromérica de alguns cromossomos em *T. jaracatia*, e um bloco marcador espécie-específico na região intersticial do par submetacêntrico 15 de *T. neivai* (Fig. 1b, d). Nenhum bloco heterocromático intersticial foi detectado em *T. jaracatia*.

A impregnação pelo nitrato de prata revelou apenas um par cromossômico subtelocêntrico marcado no braço curto em posição terminal (par 28) nas duas espécies (Fig. 1, em destaque), dado confirmado pela hibridização com sonda de rDNA 18S (Fig. 2). É provável que esses pares sejam correspondentes entre as espécies. Segundo Ravedutti e Júlio Jr (2001), RONS simples em posição intersticial parece ser uma característica de Auchenipteridae. Em Doradidae (grupo-irmão), as RONS variam em quantidade e morfologia dos cromossomos portadores entre as 16 espécies até o momento estudadas (Milhomem et al. 2008). Segundo os mesmos autores, inversões pericêntricas e/ou paracêntricas podem ter agido na evolução cariotípica do grupo modificando a localização deste sítio. Situação semelhante pode ter ocorrido em Auchenipteridae. Apesar de haver pequenas variações na localização desse sítio entre as espécies dessa família, é provável que esse par portador do rDNA 18S seja correspondente entre elas. Diante deste contexto, o fato das RONS sempre estarem localizadas em um único par cromossômico pode sugerir que este seja um caráter ancestral do clado composto por

Auchenipteridae e Doradidae. Em relação às espécies de *Tatia*, os dados para este par cromossômico também sugerem um status conservado para o gênero devido à localização e morfologia do par de cromossomos portador deste gene.

Os dados de mapeamento físico por FISH de rDNA 5S são escassos em Auchenipteridae, sendo apenas referentes a populações de *P. galeatus* (Lui et al. 2010). Esses sítios se apresentaram localizados em posição intersticial de dois pares submetacêntricos: um par no braço curto e o outro no braço longo, os quais variam em localização no cariótipo entre as populações desta espécie. Nas duas espécies do gênero *Tatia* foram observados dois pares submetacêntricos (pares 18 e 19 em *T. jaracatia*; pares 21 e 22 em *T. neivai*) portando os genes de rDNA 5S, com similar localização aos dois pares portadores de rDNA 5S nas diferentes populações *P. galeatus* (Lui et al. 2010). É provável que devido à morfologia e localização similar, que esses pares sejam considerados correspondentes entre as espécies, mesmo elas apresentando grande distância filogenética dentro da família. O par metacêntrico 4 apresenta rDNA 5S em posição intersticial no braço curto, o qual é compartilhado pelas duas espécies de *Tatia*. Esses clusters de rDNA 5S do par 4 e nos outros dois anteriormente citados podem ser considerados correspondentes entre *T. jaracatia* e *T. neivai*, entretanto, o sítio presente no par subteloentríco 29 em posição terminal no braço curto parece ser uma característica exclusiva de *T. jaracatia*. Apesar da condição múltipla com mais de dois pares portadores do cístron de rDNA 5S ser compartilhada por mais espécies de Auchenipteridae, esse marcador parece apresentar maior diversidade na família Auchenipteridae quando comparamos aos outros marcadores comumente utilizados.

Segundo hipótese filogenética de Soares-Porto (1998) com as espécies que, na época, eram consideradas válidas para a subfamília Centromochlinae, *T. neivai* é grupo-irmão de *T. boemia*, sendo esta última encontrada apenas na bacia do rio Uruguai. Essas duas espécies somadas a *T. jaracatia* que foi recentemente descrita (Pavanelli e Bifi 2009) são as únicas válidas para a bacia do Prata. Assim, é provável que a proximidade filogenética entre *T.*

jaracatia e *T. neivai* possa explicar a grande semelhança em relação aos marcadores cromossômicos entre elas.

Desta forma, apesar da grande distância geográfica que separa as espécies deste trabalho é possível supor que *T. neivai* e *T. jaracatia* apresentem proximidade filogenética, o que explica a similaridade encontrada entre a maioria dos marcadores. Entretanto, quando comparamos as duas espécies de *Tatia* deste trabalho com as outras de Auchenipteridae, podemos observar que a fórmula cariotípica (principalmente devido a ausência de cromossomos acrocêntricos), o padrão de heterocromatina e a distribuição do rDNA 5S diferem do restante do grupo mostrando algumas características que até então, parecem ser intrínsecas do gênero *Tatia*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares, ao técnico de laboratório Pedro Luis Gallo e ao Getech (Grupo de Pesquisa em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos da UNIOESTE) pelo apoio de coleta. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. (eds PA Backup, NA Menezes, MS Ghazzi), Série Livros 23. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 116-120.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103–120.

- Birindelli JLO (2010) Relações filogenéticas da superfamília Doradoidea (Ostariophysi, Siluriformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 377p.
- Eler ES, Dergam JA, Venere PC, Paiva LC, Miranda GA, Oliveira AA (2007) The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica* 130: 99-103.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype , C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios* 72: 19-22.
- Fenocchio AS, Dias AL, Margarido VP, Swarça AC (2008) Molecular cytogenetic characterization of *Glanidium ribeiroi* (Siluriformes) endemic to the Iguazu river, Brazil. *Chromosome Science* 11: 61-66.
- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. (eds RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris Jr) Edipucrs. Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Foresti F, Oliveira O, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Hatanaka T, Galetti Jr PM (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Lowe-McConnell RH (1987) Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge University Press, Cambridge, 382 p.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552-559.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133:39-46.
- Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr. JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2008) Cytogenetic studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarí and Xingú rivers, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31: 256-260.
- Pavanelli CS, Bifi AG (2009) A new *Tatia* (Ostariophysi: Siluriformes: Auchenipteridae) from the rio Iguaçu basin, Paraná state, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 7: 199-204.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934–2938.

- Pinna MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena). Edipucrs. Porto Alegre, 279-330.
- Ravedutti CG, Júlio Jr HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66: 65-70.
- Sarmiento-Soares L, Martins-Pinheiro RF (2008) A systematic revision of *Tatia* (Siluriformes: Auchenipteridae: Centromochlinae). *Neotropical Ichthyology* 6: 495-542.
- Soares-Porto LM (1998) Monophyly and interrelationships of the Centromochlinae (Siluriformes: Auchenipteridae). In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena). Edipucrs. Porto Alegre, 331-350.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.

Figuras

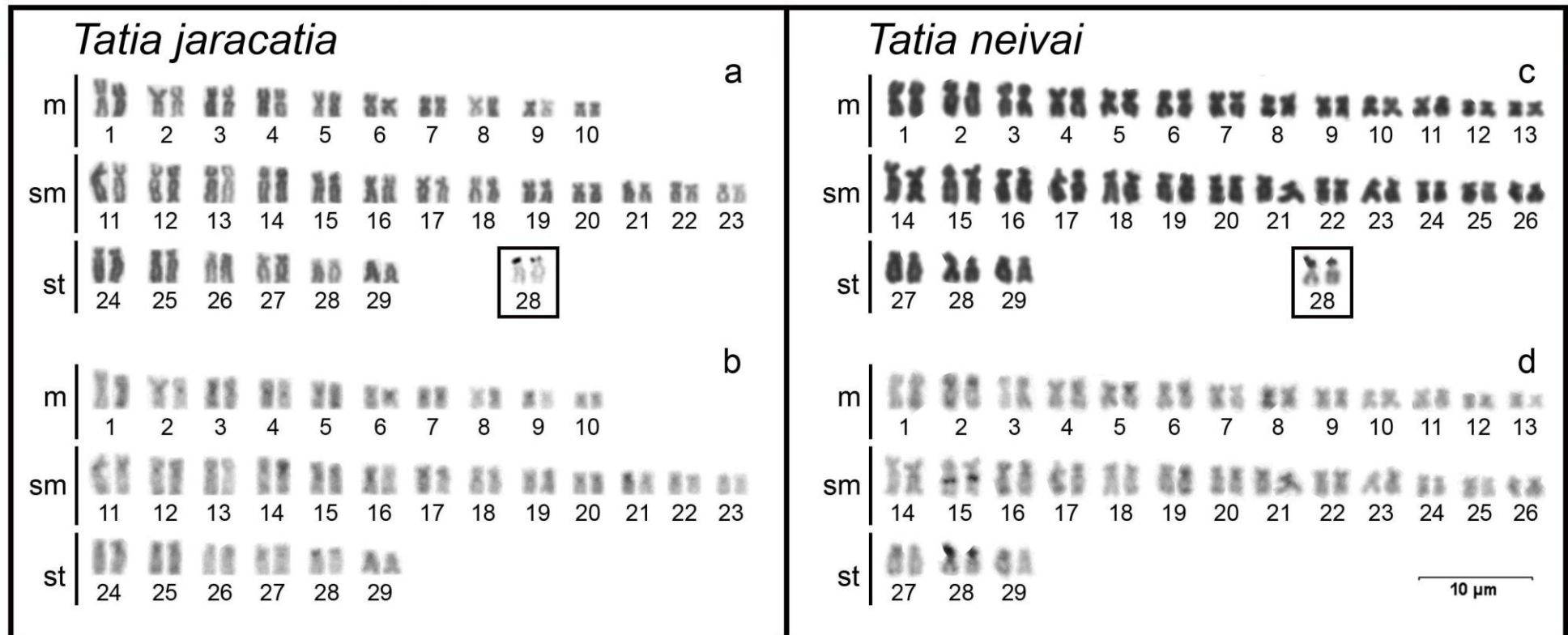


Figura 1 Cariótipos de *Tatia jaracatia* (a, b) e *Tatia neivai* (c, d) corados com Giemsa (a, c) e sequencialmente C-bandados (b, d). Em destaque os pares portadores das RONS impregnados pelo nitrato de prata.

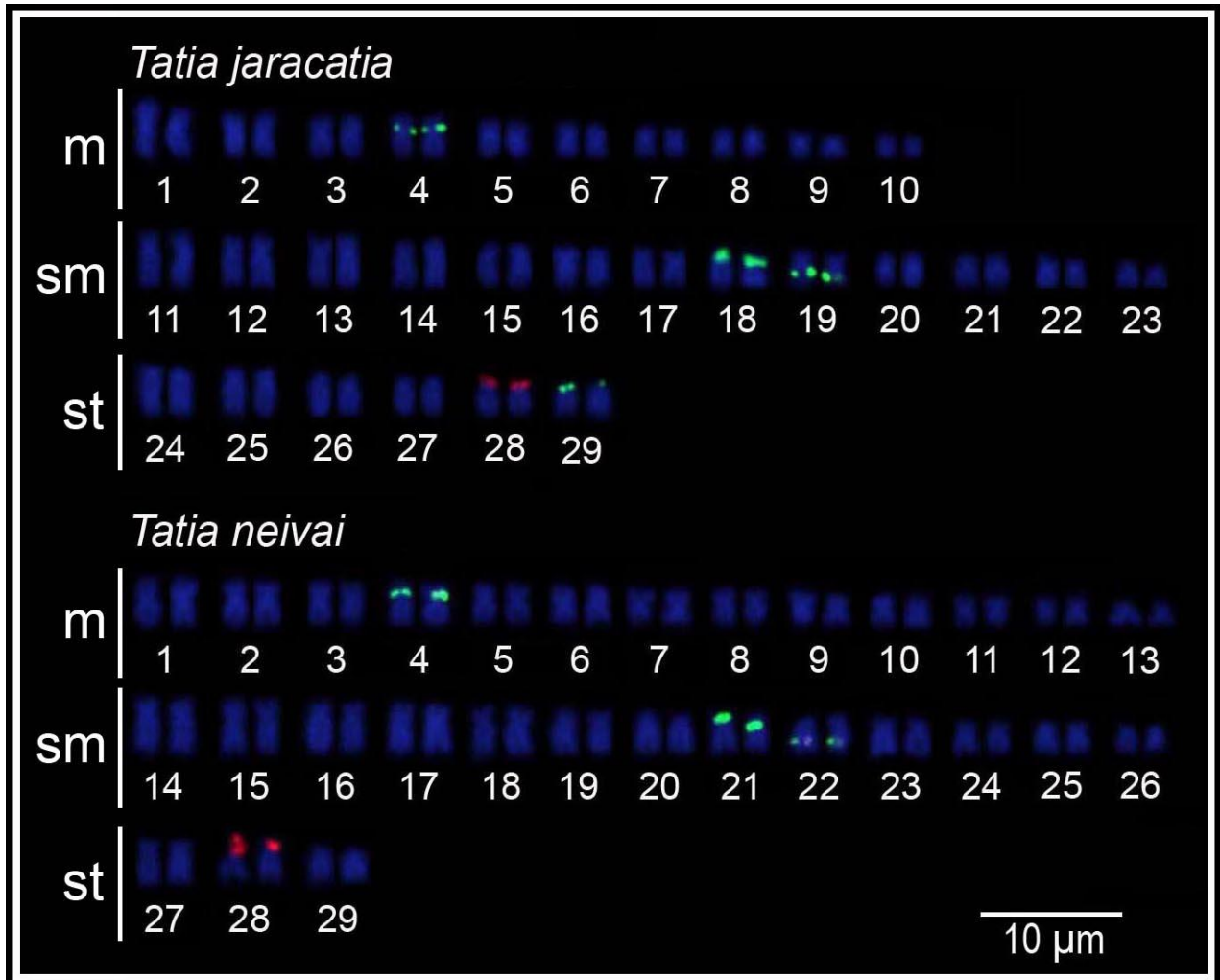


Figura 2 Cariótipos de *Tatia jaracatia* e *Tatia neivai* hibridizados com rDNA 5S (FITC – verde) e 18S (digoxigenina – vermelho).

Capítulo IV

Mapeamento físico de elementos repetitivos e fragmentação populacional de

***Glanidium ribeiroi* (Siluriformes, Auchenipteridae)**

Resumo

O rio Iguaçu é um afluente da margem esquerda do rio Paraná que foi separado desta bacia a aproximadamente 22 milhões de anos com o surgimento das Cataratas do Iguaçu. Esse rio é caracterizado por elevado endemismo, o que se deve a dois fatores: sua acidentada topografia e ao antigo isolamento proporcionado pela formação das cataratas. No presente trabalho foi analisado cromossomicamente uma população de *Glanidium ribeiroi* coletada em uma região que corresponde ao trecho final desse rio, através de coloração com Giemsa, bandamento-C, impregnação pelo nitrato de prata e FISH com sondas de rDNA 5S, rDNA 18S, sequência telomérica [TTAGGG]_n e repetições [GATA]_n. O número diplóide encontrado foi igual a 58. A heterocromatina se mostrou dispersa na região terminal de quase todos os cromossomos. As Ag-RONs são simples e presentes no braço curto em posição intersticial do par submetacêntrico 14, o que foi confirmado pela FISH com rDNA 18S. O rDNA 5S marcou apenas o par submetacêntrico 16, no braço longo intersticial. A hibridização com sonda [TTAGGG]_n revelou todos os telômeros marcados conforme esperado e ausência de ITS. As repetições [GATA]_n se apresentaram dispersas no genoma da espécie, com preferencial localização na região terminal de todos os cromossomos. Os dados aqui obtidos são discutidos com os de outras espécies de Auchenipteridae, especialmente de *G. ribeiroi* anteriormente analisados do rio Iguaçu. Diferenças populacionais são constatadas em decorrência do isolamento geográfico ocasionado pelas inúmeras cachoeiras existentes no curso do rio Iguaçu.

Palavras-chave: Centromochlinae, rio Iguaçu, rDNA 5s, rDNA 18S, [TTAGGG]_n, [GATA]_n

Introdução

Entre os Siluriformes, Auchenipteridae compreende um grupo de peixes endêmicos da região Neotropical. Esta família está distribuída em 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr 2007), sendo que 74 destas já foram registradas em território brasileiro (Akama e Sarmento-Soares 2007). Segundo Ferraris Jr (2003), Auchenipteridae é dividida em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. A maioria dos gêneros pertence à subfamília Auchenipterinae, sendo que apenas *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Tatia* e *Glanidium* estão alocados em Centromochlinae (Soares-Porto 1998). A subfamília Centromochlinae possui 31 espécies válidas, e 7 dessas são referentes ao gênero *Glanidium* (Ferraris Jr 2007). Entre elas, *G. ribeiroi*, a qual até pouco tempo atrás era considerada endêmica da bacia do rio Iguaçu (Ferraris Jr 2007); entretanto, segundo Akama e Sarmento-Soares (2007), pode ser encontrada em alguns outros rios na bacia do Paraná, nos estados do Paraná e de São Paulo, Brasil.

A bacia do rio Iguaçu é caracterizada por um elevado endemismo que tem como principal causa o surgimento das cataratas do Iguaçu (72 metros) no trecho final do seu curso, que ocorreu a aproximadamente 22 milhões de anos atrás (Agostinho et al. 2004). Segundo Zawadzki et al. (1999), o endemismo da ictiofauna dessa bacia pode chegar a 75%. Além dessa grande barreira geográfica (cataratas do Iguaçu) separando a parte final do seu curso do rio Paraná, outras barreiras segmentando o rio Iguaçu foram relatadas ao longo do seu curso, como os chamados, Salto Caiacanga (9 metros), Salto Grande (13 metros), Salto Santiago (40 metros), Salto Osório (30 metros) (Maack 1981). Entretanto, essa realidade vem mudando nas últimas décadas por que a maioria dos saltos e corredeiras que caracterizavam o rio Iguaçu foram inundadas devido a uma sequência de reservatórios para geração de energia hidrelétrica (Júlio Jr et al. 1997) (Fig. 1).

Ingenito et al. (2004) relataram 81 espécies válidas para esta bacia, e quando comparada a outros afluentes da bacia hidrográfica do Paraná, o rio Iguaçu é considerado como tendo baixo número de espécies (Júlio Jr et al. 1997). Os estudos cromossômicos relacionados à bacia do rio Iguaçu contemplam 24 espécies nominalmente válidas, além de pelo menos outras 10 que ainda

não haviam sido descritas (Kantek et al. 2007). Com relação aos Auchenipteridae, os estudos cromossômicos compreendem apenas espécies dos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Fenocchio e Bertollo 1992; Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010). Em relação ao rio Iguaçu, há apenas duas espécies válidas dessa família, *Tatia jaracatia* e *Glanidium ribeiroi*, e somente a última possui análise cromossômica (Tab. 1).

Este trabalho teve por objetivo analisar cromossomicamente uma população de *Glanidium ribeiroi* ainda não estudada da bacia do rio Iguaçu em uma região que compreende o trecho final desse rio, comparando com os dados de outras três populações desta espécie pertencentes a outros três trechos/segmentos do rio Iguaçu, buscando verificar o grau de variabilidade cromossômica entre as populações.

Tabela 1 Dados citogenéticos de diferentes populações de *Glanidium ribeiroi* do rio Iguaçu.

Localidade	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Ag-RONs	rDNA 5S	(TTAGGG) _n	(GATA) _n	Ref
Reservatório de Segredo, PR, Brasil	58	106	22m+16sm+10st+10a	s, p, par 23, sm	-	-	-	1
Reservatório de Salto Osório, PR, Brasil	58	106	22m+16sm+10st+10a	s, p, par 24, sm	-	-	-	1
Reservatório de Salto Caxias, PR, Brasil	58	112	28m+16sm+10st+4a	s, p, par 17, sm	-	-	-	2
Rio Iguaçu, município de Capanema, PR, Brasil	58	110	22m+20sm+10st+6a	s, p, par 23, sm	s, q, par 16, sm	Telômeros marcados, sem ITS	Dispersa coincidente com heterocromatina terminal	3

PR= Estado do Paraná; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; s=simples; p=braço curto; q=braço longo; sm=submetacêntrico. Referências: 1) Fenocchio et al. (2008); 2) Ravedutti e Júlio Jr. (2001); 3) Presente trabalho.

Materiais e Métodos

Foi realizada análise cromossômica em 43 exemplares (20 machos e 23 fêmeas) de *Glanidium ribeiroi* da bacia do rio Iguaçu, município de Capanema - PR (25°35'19.6"S; 53°54'48.2"W) (Fig. 1). Os exemplares foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e estão catalogados (MZUSP 109797). A preparação das suspensões celulares de cromossomos mitóticos foi obtida de células do rim anterior (Foresti et al. 1993). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão heterocromático foi determinado através de Sumner (1972) com modificações de Lui et al. (2012a), em lâminas previamente analisadas com coloração convencional Giemsa, as quais foram descoradas em fixador (3 metanol: 1 ácido acético) e submetidas ao bandamento-C (análise seqüencial). As NORs foram identificadas utilizando impregnação pelo nitrato de Prata (Howell e Black 1980), e esta preparação foi efetuada em metáfases anteriormente coradas por Giemsa e C-bandadas (análise seqüencial).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel et al. (1986), usando sondas de rDNA 18S (Hatanaka e Galetti Jr 2004), rDNA 5S (Martins et al. 2000), [TTAGGG]_n e [GATA]_n, as quais foram amplificadas sem DNA molde através de reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) como descrito por Ijdo et al. (1991). A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina-16-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Biotin Nick Translation Mix - Roche). A sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Dig 11 Nick Translation Mix - Roche). As seqüências [TTAGGG]_n e [GATA]_n foram marcadas por PCR, com dUTP-16-biotina e digoxigenina-11-dUTP, respectivamente. (Roche Applied Science). Todas as hibridizações foram realizadas com 77% de estringência (200 ng de cada sonda, 50% de

formamida, 10% de sulfato dextrano, 2xSSC; pH 7.0 – 7.2). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51. O software DP2-BSW (Olympus) foi utilizado para a captura das imagens.

Resultados

O número diplóide encontrado para *Glanidium ribeiroi* foi igual a 58 cromossomos (22m + 20sm + 10st + 6a, NF=110) (Fig. 2a). A heterocromatina foi localizada em regiões terminais de vários cromossomos fracamente marcados, além de um bloco mais forte correspondente às NORs, e outro adjacente a este mesmo sítio (Fig. 2b). A impregnação pelo nitrato de prata apresentou somente o par submetacêntrico 14 marcado no braço curto em posição intersticial (Fig. 2, em destaque). A hibridização com as sondas de rDNA 5S e 18S mostrou apenas um par cromossômico para cada uma das sondas, sendo o par submetacêntrico 14 no braço curto em posição intersticial para o rDNA 18S, e o par 16 submetacêntrico no braço longo em posição intersticial para o rDNA 5S (Fig. 3a). A FISH com sonda telomérica [TTAGGG]_n mostrou todos os telômeros hibridados conforme o esperado, nenhum ITS (sequência telomérica intersticial), além de um sinal de hibridização um pouco mais destacado na região terminal do braço curto do par 14 adjacente à NOR (Fig. 3b1). A hibridização com a sequência repetitiva [GATA]_n se mostrou dispersa em todo o genoma da espécie, mas com uma localização preferencial na região terminal de todos os cromossomos; entretanto, apesar de em menor quantidade, também se mostrou presente nas regiões cromossômicas intersticiais (Fig. 3c2).

Discussão

Os poucos estudos cromossômicos em Auchenipteridae sugerem que nessa família o número diplóide igual a 58 é uma característica do grupo (Ravedutti e Júlio Jr 2001). Com exceção das espécies de *Ageneiosus*, as quais apresentam número diplóide diferente de 58, os outros gêneros que apresentam análises citogenéticas (*Auchenipterus*, *Glanidium* e

Parauchenipterus) compartilham esse padrão conservado do número diplóide 58. O grupo-irmão de Auchenipteridae é Doradoidae (Pinna 1998), que apresenta número diploide igual a 58 (Milhomem et al. 2008), o mesmo que está sendo considerado para Auchenipteridae (Lui et al., in press). Este mesmo número foi encontrado para a população de *G. ribeiroi* deste trabalho e para outras populações dessa mesma espécie anteriormente estudadas (Tab. 1) (Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008). O número fundamental da população deste estudo foi 110; entretanto, o NF das outras três populações é um pouco diferente, o que é decorrente de suas respectivas fórmulas cariotípicas.

Exemplos em que o número diplóide é conservado e há diferenças na fórmula cariotípica são muito comuns em peixes neotropicais, como por exemplo, em *H. malabaricus* (Erythrinidae) (Blanco et al. 2010); *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae) (Mazzuchelli et al. 2007) *Hypostomus* spp. (Loricariidae) (Bueno et al. 2012), entre outros. Rearranjos do tipo translocações e/ou inversões pericêntricas são normalmente atribuídos como responsáveis por estas diferenças populacionais. Tal fato é reforçado pela hibridização com sequência telomérica (TTAGGG)_n que não evidenciou nenhum ITS, fato este que corrobora as proposições de que rearranjos não-robertsonianos estejam mais intrinsecamente relacionados à evolução cariotípica dessa espécie. A não detecção de ITS não confirma a ausência de rearranjos robertsonianos, pois um evento de fusão não precisa necessariamente resultar em um cromossomo que apresente resquícios de sequência telomérica na região cromossômica intersticial (Slijepcevic 1998). Entretanto, este é um aspecto que reforça a hipótese de não ocorrência de eventos robertsonianos devido à conservação no número diplóide e variação na fórmula cariotípica em *G. ribeiroi*.

A maioria das espécies de Auchenipteridae analisadas pelo bandamento-C dos gêneros *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Glanidium* e *Parauchenipterus* (Ravedutti e Júlio Jr 2001; Fenocchio et al. 2008; Lui et al. 2009; Lui et al. 2010; presente trabalho) verifica-se um padrão de distribuição de heterocromatina preferencialmente alocado em regiões terminais, sendo normalmente blocos fracos, os quais parecem ser uma característica na família. O único bloco

heterocromático um pouco mais fortemente marcado foi o correspondente ao braço curto do par onde estão localizadas as NORs, sendo todo o braço cromossômico heterocromático. A população do reservatório de Salto Caxias (Ravedutti e Júlio Jr 2001) também apresentou a região das NORs heterocromática. As outras duas populações (reservatório de Salto Segredo e Salto Osório) (Fenocchio et al. 2008) não apresentaram este sítio banda C positivo; entretanto, as regiões que flanqueiam (acima e abaixo) esses sítios de NOR se mostraram banda C positiva. Dessa forma, diferenças no padrão de bandamento do braço curto do par portador das NORs podem ser detectadas entre as populações.

Na população deste trabalho, a impregnação pelo nitrato de prata revelou apenas um par cromossômico submetacêntrico marcado no braço curto em posição intersticial (par 14), dado confirmado pela hibridização com sonda de rDNA 18S. Nas outras três populações dessa espécie, um par submetacêntrico é portador das NORs; entretanto, pequenas variações da sua localização no cariótipo podem ser vistas. Dois interessantes fatores relacionados a esse par de NORs são provenientes da hibridização com sequência telomérica $(TTAGGG)_n$ e as repetições $(GATA)_n$. O maior sinal de hibridização com $(TTAGGG)_n$ está na região terminal do braço curto adjacente ao sítio de rDNA 18S. A amplificação de telômero adjacentes às NORs deve ter como função aumentar a proteção e a estabilidade dessas regiões de DNA ribossomal, uma vez que tais genes são de fundamental importância para a célula. Em relação às repetições $(GATA)_n$, o par 14 apresentou a região terminal no braço longo (sinal forte) e proximal ao centrômero marcado; entretanto, no braço curto onde as NORs estão localizadas em posição intersticial, não foi possível visualizar sinal de hibridização.

O elemento repetitivo $(GATA)_n$ é conservado em diferentes espécies animais, incluindo humanos (Subramanian et al. 2003; Srivastava et al. 2008). Essa sequência parece estar associada na determinação e evolução de cromossomos sexuais em grupos de cobras (Jones e Singh 1985). Até o momento, nenhum sistema de cromossomos sexuais foi descrito em Auchenipteridae, entretanto, esta sequência se mostrou altamente dispersa no genoma de *G. ribeiroi* como

demonstrado neste trabalho. Esta mesma situação é encontrada no genoma de outras espécies de Auchenipteridae, como em *A. inermis* (Lui et al., in press).

A localização da sequência $(GATA)_n$ em *G. ribeiroi* se mostrou correspondente a localização das heterocromatinas na região terminal de quase todos os cromossomos, também estando presente em regiões intersticiais em menor quantidade (Fig. 3c1, 3c2). Segundo Subramanian et al. (2003), esta sequência parece estar relacionada a diversas funções no genoma humano, inclusive na regulação gênica. Além disso, é concomitantemente encontrada no cromossomo Y onde estão os genes determinantes sexuais, sendo sugerido pelos autores que ela possa também estar funcionalmente relacionada. Pouco pode ser dito sobre essa dispersa localização no genoma de *G. ribeiroi*, entretanto, a princípio se pode imaginar que as repetições $(GATA)_n$ podem ser uma simples sequência repetitiva que faça parte da estrutura da heterocromatina dessa espécie, ou de forma hipotética, até estar relacionada a funções regulatórias como já estabelecido para humanos.

O mapeamento de rDNA 5S é ainda mais raro para Auchenipteridae do que os dados de rDNA 18S. *P. galeatus* apresenta esta sequência localizada em posição intersticial de dois pares submetacêntricos, sendo em um par no braço curto e no outro no braço longo (Lui et al. 2010). A localização intersticial no braço longo do par submetacêntrico 16 em *G. ribeiroi* sugere que esse par possa ser correspondente a um par submetacêntrico de *P. galeatus*, que também apresentou o sítio de rDNA 5S localizados no braço longo em posição intersticial.

O isolamento de peixes de água doce nos seus sistemas hidrográficos estreita o relacionamento entre as histórias naturais da ictiofauna e das bacias as quais pertencem. As alterações que ocorrem nas bacias e seus tributários, por motivos naturais ou ações antrópicas, influenciam todo o ecossistema, tornando peculiar a história natural das populações que a compõem. Segundo Castro (1999), a maioria das espécies de peixes de pequeno porte apresenta capacidade de deslocamento relativamente restrita dentro de grandes bacias hidrográficas. Dessa forma, ao longo dos milhões de anos durante a evolução dos peixes neotropicais, ocorreram

alterações geográficas e ecológicas nos sistemas hídricos, gerando numerosos exemplos de vicariância, criando isolados populacionais com fluxo gênico extremamente reduzido ou inexistente. Em *P. galeatus* que possui distribuição ampla em bacias hidrográficas sul-americanas, diferenças deste mesmo tipo foram detectadas e se mostraram importantes na investigação das relações biogeográficas de populações relacionadas a uma região de transposição de rio. As inferências elaboradas por dados cromossômicos (Lui et al. 2010) foram corroboradas por análise molecular de DNA mitocondrial (Lui et al. 2012b). Os dados cromossômicos de *G. ribeiroi* deste estudo comparados com os de trabalhos anteriores (Tab. 1) apresentam uma similar condição em relação a essas populações de *P. galeatus*, entretanto, vale ressaltar que todas as populações de *G. ribeiroi* estão no mesmo rio, sugerindo que a fragmentação de habitats pode estar relacionada a um processo de diversificação cariotípica.

Estudos com outras espécies do rio Iguaçu demonstram alta variabilidade genética entre populações de uma mesma espécie (Agostinho et al. 1999), que reforça a importância dos dados cromossômicos de *G. ribeiroi*. Outras espécies do rio Iguaçu também possuem dados similares que sugerem fragmentação de populações, como *Astyanax altiparanae*, *Oligosarcus longirostris*, *Corydoras paleatus* e *Pimelodus ortomanni*, entre outros (Kantek et al. 2007), sendo que a maior parte desses dados foram obtidos depois da construção das barragens. Com relação a *G. ribeiroi*, há dados de coleta na maior parte do rio Iguaçu, compreendendo todo o curso com barragens (Suzuki, 1999; Cassemiro et al. 2005; Agostinho et al. 2004), com exceção para alguns rios do Alto Iguaçu (Ingenito 2004). Apesar de algumas barreiras terem deixado de existir na história recente devido à construção de uma série de barragens de usinas hidrelétricas (após 1975), é provável que as fragmentações populacionais possam ser consequência da série de cachoeiras e saltos que existiram no rio Iguaçu.

Isto revela que cada população da ictiofauna do rio Iguaçu representa um diversificado patrimônio genético que deve ser conservado. Por exemplo, somente no reservatório de Segredo, mais do que quinze espécies foram consideradas em risco de extinção (Agostinho et al. 1999).

Devido ao recente crescimento urbano ao redor desta bacia, programas de conservação e manejo da ictiofauna do rio Iguaçu são de grande importância, não somente em função do seu alto endemismo em nível interespecífico, mas também pelo patrimônio genético único em nível intraespecífico, sendo que extinções locais podem conduzir a perda de variabilidade genética.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Heraldo Antonio Britski pela identificação dos exemplares, ao técnico Pedro Luis Gallo e ao Getech (Grupo de Pesquisa em Tecnologia de Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros e Hídricos da UNIOESTE) pelo apoio de coleta. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

- Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Júlio Jr HF (1999) Riscos da implantação de cultivos de espécies exóticas em tanques-redes em reservatórios do rio Iguaçu. *Cadernos de Biodiversidade* 2: 1-9.
- Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Júlio Jr HF (2004) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, (eds J Carolsfeld, B Harvey, C Ross, A Baer). IDRC publications, 380p.
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Eduem, Maringá.

- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. (eds PA Buckup, NA Menezes, MS Ghazzi), Série Livros 23. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 116-120.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. *Neotropical Ichthyology* 8: 361-368.
- Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP (2012) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosome types. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22: 241-250.
- Casemiro FAZ, Hahn NS, Delariva RL (2005) Estrutura trófica da ictiofauna, ao longo do gradiente longitudinal do reservatório de Salto Caxias (rio Iguaçu, Paraná, Brasil), no terceiro ano após o represamento. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 27: 63-71.
- Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: *Ecologia de Peixes de Riachos* (eds EP Caramaschi, R Mazzoni, CRSF Bizerril, PR Peres-Neto). Série Oecologia Brasiliensis, vol VI, Rio de Janeiro, 139-155.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1992) Karyotype, C-bands and NORs of the neotropical siluriform fish *Ageneiosus brevifilis* and *Ageneiosus atronases* (Ageneiosidae). *Cytobios* 72: 19-22.
- Fenocchio AS, Dias AL, Margarido VP, Swarça AC (2008) Molecular cytogenetic characterization of *Glanidium ribeiroi* (Siluriformes) endemic to the Iguaçu river, Brazil. *Chromosome Science* 11: 61-66.
- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. (eds RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris Jr) Edipucrs. Porto Alegre, 470-482.

- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Foresti F, Oliveira O, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Hatanaka T; Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Ingenito LFS, Duboc LF, Abilhoa LF (2004) Contribution to the knowledge of the ichthyofauna from the upper Iguaçú river basin, Paraná, Brazil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 7: 23-36.
- Jones KW, Singh L (1985) Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends in Genetics* 1: 55-61.
- Júlio Jr HF, Bonecker CC, Agostinho AA (1997) Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçú. In: *Reservatório de segredo: bases ecológicas para o manejo* (eds Agostinho AA, Gomes LC). Eduem. Maringá, Brasil.
- Kantek DLZ, Cipriano RR, Abilhoa V, Artoni RF, Cestari MM (2007) Cytotaxonomic and evolutionary considerations about karyotypic data of fishes from the Iguaçú river basin in south of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 793-802.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40: 552-559.

- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012a) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87 (7): 433-438.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Kuhn GCS, Gomes VN, Prioli AJ, Moreira-Filho O (2012b) A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Mitochondrial DNA* 23 (5): 388-395.
- Maack R (1981) Geografia física do Estado do Paraná. Segunda edição. Rio de Janeiro: J. Olympio: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 442p.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133:39-46.
- Mazzuchelli J, Swarça AC, Dias AL (2007) Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculatus* La Cepède, 1803 Population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR. *Brazilian Journal of Biology* 67: 631–633.
- Milhomem SSR, Souza ACP, Nascimento AL, Carvalho Jr JR, Feldberg E, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2008) Cytogenetic studies in fishes of the genera *Hassar*, *Platydoras* and *Opsodoras* (Doradidae, Siluriformes) from Jarí and Xingú rivers, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31: 256-260.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 83: 2934–2938.

- Pinna MCC (1998) Phylogenetics relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena). Edipucrs. Porto Alegre, 279-330.
- Ravedutti CG, Júlio Jr HF (2001) Cytogenetic Analysis of Three Species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia* 66: 65-70.
- Srivastava J, Premi S, Kumar S, Ali S (2008) Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoal transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. *BMC Genomics* 9: 132.
- Slijepcevic P (1998) Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- Soares-Porto LM (1998) Monophyly and interrelationships of the Centromochlinae (Siluriformes: Auchenipteridae). In: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. (eds LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena). Edipucrs. Porto Alegre, 331-350.
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of *Bkm* sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681-685.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Suzuki HI (1999) Estratégias reprodutivas de peixes relacionadas ao sucesso na colonização em dois reservatórios do rio Iguaçu, PR, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos.
- Zawadski CH, Renesto E, Bini LM (1999) Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Locariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brasil). *Revue Suisse de Zoologie* 106: 91-105.

Figuras

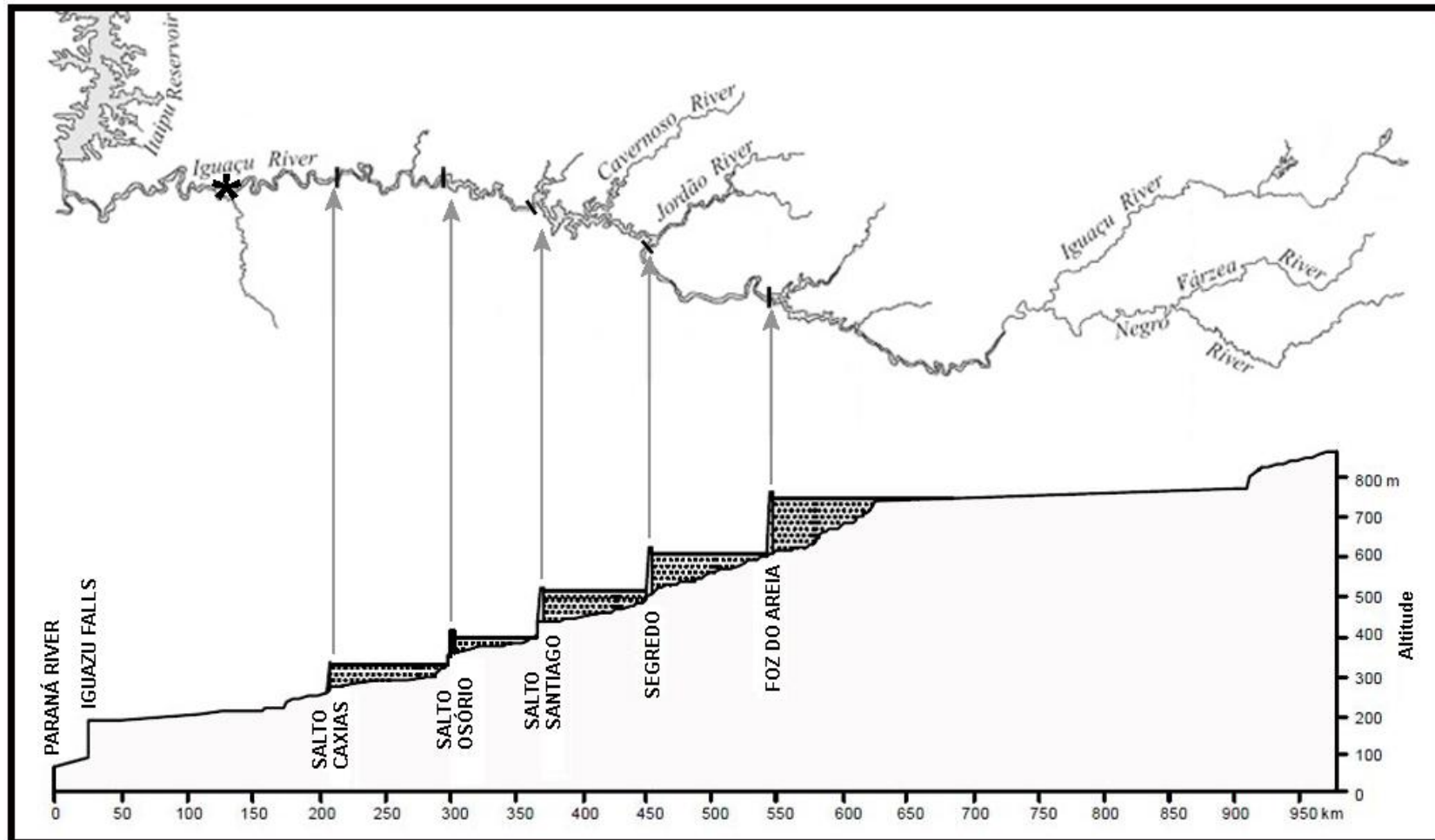


Figura 1 Mapa e perfil longitudinal da bacia do rio Iguacu, mostrando seus pontos de represamento e sua acidentada topografia. O ponto de coleta de exemplares de *Glanidium ribeiroi* deste trabalho está evidenciado com um asterisco. Modificado de Júlio Jr et al. (1997) e Daga e Gubiani (2012). As setas indicam as barragens construídas na calha principal do rio Iguacu.

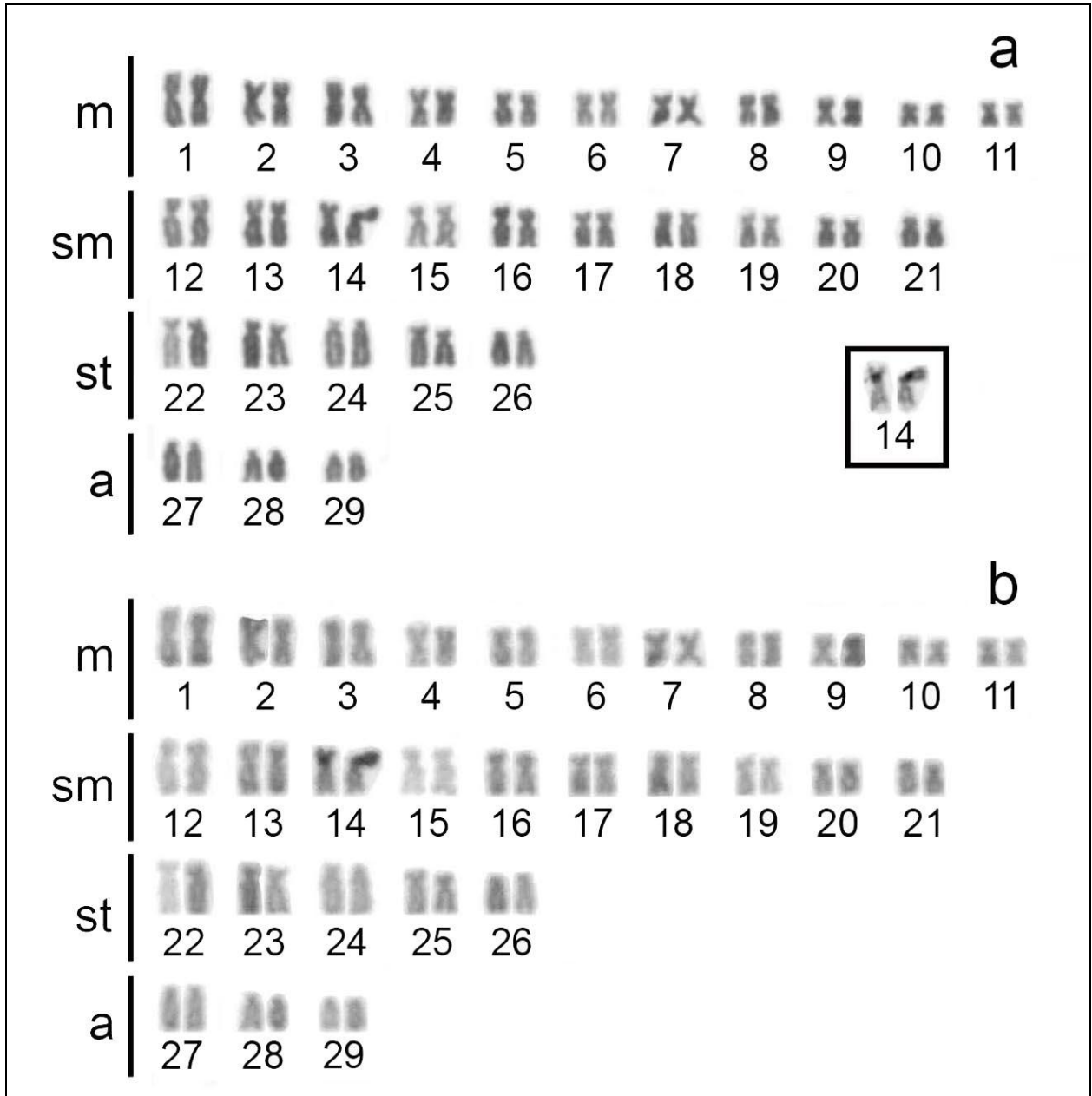


Figura 2 Cariótipo de *Glanidium ribeiri* do rio Iguçu (trecho final da bacia, município de Capanema - PR) corado com Giemsa (a) e C-bandado (b). Par portador das Ag-RONs (em destaque).

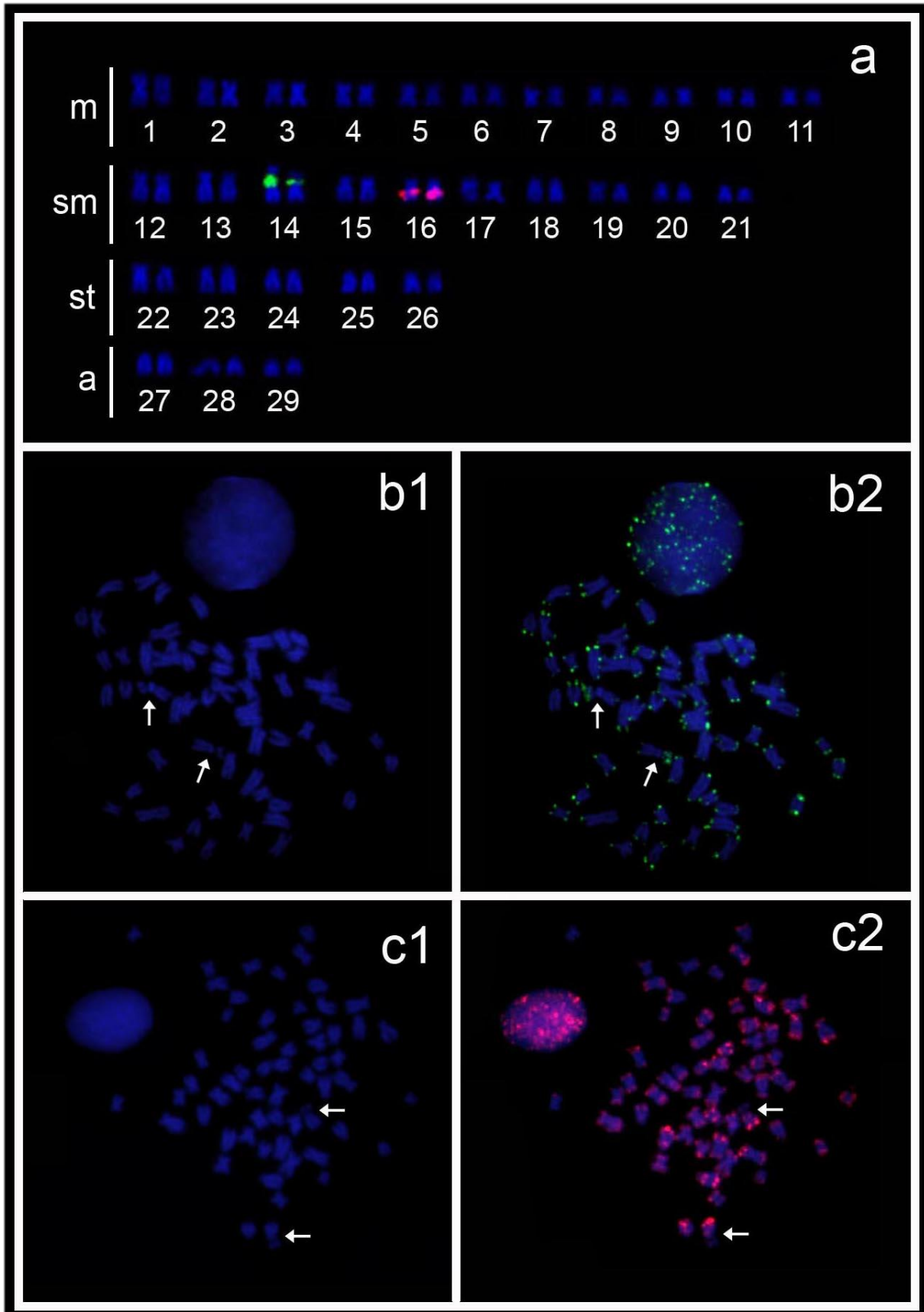


Figura 3 Cariótipo de *Glanidium ribeiroi* do rio Iguçu hibridizado com DNAr 18S (FITC, sonda verde) e 5S (Rodamina, sonda vermelha). Metáfases de *Glanidium ribeiroi* hibridizadas com sequência telomérica $[TTAGGG]_n$ (b1 e b2) e repetições $[GATA]_n$ (c1 e c2).

Capítulo V

Iodeto de Propídeo torna as regiões de heterocromatina mais evidentes no bandamento-C

Biotechnic & Histochemistry (2012) 87 (7): 433-438.

Resumo

A detecção de regiões de heterocromatina tem sido alvo de intensa investigação. Neste trabalho, foi investigado uma adaptação de uma técnica comumente utilizada, substituindo o corante não-fluorescente, Giemsa, por um fluorescente, Iodeto de Propídeo. Esta modificação gera um maior contraste das bandas heterocromáticas de cromossomos metafásicos, podendo ser valiosa principalmente quando os organismos estudados apresentam heterocromatinas pálidas e de difícil visualização. Aspectos relacionados ao processo de interação desses dois corantes com a molécula de DNA e de excitação do corante fluorescente quando irradiado com a luz ultravioleta são aqui discutidos.

Introdução

Os estudos de heterocromatina através do bandamento C foram introduzidos por Pardue and Gall (1970), que descreveram a existência de uma família de DNA satélite presente na região centromérica de cromossomos de rato após o método de hibridização *in situ*. Tais autores perceberam que essa região era corada mais fortemente quando impregnada com o corante não-fluorescente Giemsa após ISH (Rocchi 1982; Jack et al. 1985). Os primeiros estudos descrevendo modificações utilizando o tratamento ácido-base-solução salina para obtenção do bandamento C foram apresentados por Arrighi and Hsu (1971) e Sumner et al. (1971). O princípio desta técnica está na degradação diferencial da cromatina utilizando soluções ácidas e básicas, que geram quebras na molécula de DNA. A solução ácida depurina o DNA, enquanto a solução básica gera o processo de β -eliminação dos sítios depurinados. Posteriormente, é realizada a incubação em solução salina quente que causa a extração deste DNA depurinado, com conseqüente remoção dos pequenos fragmentos que são mais facilmente perdidos da estrutura cromossômica (Comings 1978, Kongsuwan e Smyth 1978, Holmquist 1979, Gold et al. 1990, Sumner 1990). Durante o ciclo celular, as regiões heterocromáticas são caracterizadas como de replicação tardia e condensação precoce, ao contrário das regiões eucromáticas, que são de replicação precoce e condensação tardia (Sumner 2003). Desta forma, o ataque das soluções ácidas e básicas, aliado a esta característica de maior compactação (replicação tardia/ bandas escuras) das regiões de heterocromatina e menor compactação (replicação precoce/ bandas claras) das regiões de eucromatina durante o ciclo celular, explica este mecanismo de extração diferencial do DNA dos cromossomos durante o processo de bandamento C e a produção deste padrão longitudinal de bandas (Jack et al. 1985, Sumner 1990, 2003).

No início, a detecção de regiões heterocromáticas se mostrou de grande importância para auxiliar no pareamento de cromossomos mitóticos e meióticos, principalmente em insetos, plantas (Sumner 1990) e humanos (Chandley e Fletcher 1973). Além disso, em estudos com diversos grupos de animais e vegetais se mostrou importante para a detecção de rearranjos

cromossômicos (Castiglia et al. 2006, Catarino et al. 2006), determinação de sistemas de cromossomos sexuais (Koehler et al. 1997, Macaisne et al. 2006), organização e caracterização de genomas (Kuipers et al. 1997, Oliveira e Wright 1998, Kawagoshi et al. 2008), e entendimento da evolução cromossômica (Blanco et al. 2010).

Muito se especulou sobre a possível função deste tipo de DNA ao longo dos anos, e várias relações foram feitas, como: proteger áreas vitais do genoma de forças externas e mudanças evolutivas, auxiliar no pareamento de cromossomos homólogos durante o alinhamento inicial da meiose e regiões cromossômicas/ cromossomos não-homólogos que são funcionalmente relacionadas, estabelecer “barreiras de fertilidade” que promovam diversidade e especiação (Yunis e Yasmineh 1971), participação em sítios relacionados ao início da condensação cromossômica (Pardue e Hennig 1990), e implicações na regulação (ativação e silenciamento) incluindo alterações nos modelos de expressão de genes, replicação, reparo e recombinação do DNA (Zuckerandl e Hennig 1995, Fedoroff 2000, Kashkush et al. 2003, Dillon 2004, Hennig 2004). Além disso, até pouco tempo atrás, as heterocromatinas eram inapropriadamente nomeadas de DNA lixo (Pardue e Hennig 1990, Zuckerandl e Hennig 1995, Sumner 2003).

Atualmente, os métodos mais comuns para obtenção de bandas C, tanto para plantas quanto para animais são os de Sumner (1972) e Gold (1986). O tratamento com hidróxido de bário foi inicialmente proposto, se mostrando menos destrutivo e de fácil e rápida utilização para uso rotineiro (Sumner 1972). Muitas variações desta técnica já foram publicadas, entretanto, poucas modificações importantes foram propostas. Tais alterações foram criadas principalmente para objetivos particulares, como quando relacionadas ao uso de materiais que apresentaram algum tipo de dificuldade aos pesquisadores (Sumner 1990). Em alguns grupos de peixes, o padrão de distribuição de heterocromatina é difícil de ser obtido, geralmente pela presença de blocos pálidos corados com Giemsa (baixo contraste entre segmentos de eucromatina e heterocromatina) com distribuição restrita a poucos segmentos do genoma, como em algumas

espécies de bagres da região Neotropical, e.g., *Rhamdia quelen* (Garcia et al. 2010), *Pimelodus maculatus* (Tresco et al. 2008), *Parauchenipterus galeatus* (Lui et al. 2010), entre outros. Além disso, há casos em que bandas heterocromáticas de cromossomos sexuais de algumas espécies de Characiformes também se mostraram pálidas e de difícil visualização, como em alguns representantes da família Parodontidae, e.g., *Parodon moreirai* (Centofante et al. 2002), *Apareiodon vladii* (Rosa et al. 2006), *Apareiodon ibitiensis* (Bellafronte et al. 2009), entre outros.

A substituição do corante não-fluorescente (Giemsa) pelo fluorescente (Iodeto de Propídeo) pode ser valiosa, facilitando a visualização das regiões heterocromáticas em espécies que apresentem uma estrutura cromossômica problemática.

Materiais e Métodos

Neste estudo, foram utilizados cromossomos metafásicos de *Parauchenipterus galeatus* e *Apareiodon vladii*. A obtenção da suspensão celular de cromossomos metafásicos foi obtida usando o método de Bertollo et al. (1978). Esses cromossomos foram tratados com a técnica de bandamento C (Sumner 1972), corados com Giemsa, descorados com solução de fixação, 3:1 metanol:ácido acético, e subsequentemente corados com uma solução contendo 20 µL de anti-fading (1,4-fenilenodiamina em tampão glicerol) e 0,7 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL). As células em metáfase foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX50) e capturadas com o software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

Resultados

Bandas-C pálidas foram observadas após o tratamento ácido-base-solução salina e coloração convencional com Giemsa nas metáfases de *P. galeatus* e *A. vladii* (Fig. 1A,C). Bandas-C mais evidentes foram observadas após a coloração com iodeto de propídeo (Fig. 1B, D). Um contraste mais acentuado entre as regiões eucromáticas e heterocromáticas com o uso do

corante fluorescente pode ser observado, de forma ainda mais evidente no cromossomo B de *P. galeatus* (Fig. 1A, B) e no cromossomo W de *A. vladii* (Fig. 1C, D).

Discussão

A heterocromatina tem se mostrado um importante marcador na identificação e caracterização de cromossomos sexuais (Sumner 2003) e cromossomos B (Camacho 2005), uma vez que na maioria dos casos esses cromossomos são totalmente ou parcialmente heterocromáticos. Há duas hipóteses para a origem de sistemas de cromossomos sexuais: 1) rearranjos cromossômicos ou 2) heterocromatinização/amplificação de heterocromatina (Moreira-Filho et al. 1993; Oliveira et al. 2009). Normalmente, os cromossomos sexuais que são formados por rearranjos não exibem regiões heterocromáticas; entretanto, cromossomos sexuais formados por heterocromatinização/amplificação de heterocromatina possuem pequenas ou grandes regiões heterocromáticas. Os cromossomos heteromórficos relacionados à heterocromatinização/amplificação de heterocromatina podem ser facilmente distinguidos pelo cariótipo como em espécies do gênero *Leporinus* (Koehler et al. 1997; Molina et al. 1998), ou detectadas com maior dificuldade como em espécies da família Parodontidae (Centofante et al. 2002; Bellafronte et al. 2009).

Os cromossomos B também podem ser difíceis de visualizar. Por exemplo, o grande cromossomo B de *Astyanax scabripinnis* pode ser facilmente distinguido por sua morfologia e sua destacável heterocromatina (Néo et al. 2000); entretanto, cromossomos B heterocromáticos de populações da espécie *Rhamdia quelen* são de difícil visualização (Garcia et al. 2010; Martinez et al. 2011). Provavelmente, essas dificuldades são devido ao padrão de compactação menos acentuado dessas regiões heterocromáticas, as quais podem dificultar a análise. Esses problemas podem ser superados pela substituição do corante não fluorescente Giemsa pelo corante fluorescente iodeto de propídeo. As bandas heterocromáticas observadas em *P. galeatus*

e *A. vladii* de nosso trabalho (Fig. 1) demonstram melhor contraste das regiões de heterocromatina utilizando o iodeto de propídeo.

Desde os primeiros trabalhos com bandamento C, o corante utilizado para visualização das heterocromatinas é o Giemsa, o qual possui ampla aplicação em estudos citológicos, não só na detecção de bandamentos cromossômicos. Este corante age na dupla hélice de DNA como um intercalante e através de interações hidrofóbicas com proteínas relacionadas à sua compactação em cromossomo metafásico (Meisner et al. 1974; van Dujin et al. 1985; Ren et al. 2000). A solução de Giemsa não demonstra nenhum tipo de interação preferencial com esta molécula, ao contrário de alguns corantes fluorescentes base-específicos amplamente utilizados em estudos citogenéticos, e.g., DAPI (maior especificidade com regiões AT-ricas), e Cromomicina A₃ (maior especificidade com regiões GC-ricas), entre outros (Tanious et al. 1992; Sumner 2003).

O iodeto de propídeo é uma molécula fluorescente em que sua excitação ocorre aproximadamente a 495 nanômetros e sua emissão a 639 nanômetros, quando a molécula se apresenta no seu estado livre (forma intercalada). Este corante interage com o DNA como um intercalante sofrendo mudanças nos comprimentos de onda de excitação e emissão, para respectivamente 530 e 615 nanômetros (Arndt-Jovin e Jovin 1989). Este corante tem sido extensivamente usado em citometria de fluxo (Mazzini et al. 1983), além de sua ampla utilização em estudos citológicos. Além de sua ampla utilização como um simples corante, o iodeto de propídeo também tem sido utilizado para estudos cromossômicos em combinação com DAPI para identificar bandas CPD em plantas, as quais são normalmente regiões heterocromáticas GC-ricas associadas com NORs (She et al. 2006); entretanto, o bandamento CPD raramente é suficiente para detectar todos os sítios heterocromáticos de um genoma quando comparado a técnica de bandamento C (Peterson et al. 1999).

Em geral, o bandamento C corado com Giemsa é o método mais confiável para observação de todos os tipos de heterocromatina (Vosa 1976; Fregonezi et al. 2006), quando comparado aos métodos utilizando corantes fluorescentes base-específicos. Entretanto, o iodeto

de propídeo não é um fluoróforo que apresente interação preferencial de bases (Muller e Crothers 1975), assim, sua utilização após o bandamento C não deve ser considerada inapropriada como no caso dos corantes fluorescentes base-específicos. Em algumas situações a utilização de corantes fluorescentes base-específicos pode conduzir a errôneas interpretações, especialmente quando relacionado ao fluorocromo DAPI após o bandamento C ou FISH em cromossomos metafásicos de diferentes espécies de plantas (Barros e Silva e Guerra 2010)

O iodeto de propídeo contém quatro sistemas planares condensados que fazem com que este fluorocromo intercale entre as bases planas do DNA; além disso, esta molécula também interage com o DNA formando uma pilha em sua volta devido a interações hidrofóbicas (Marky 1990; Kim et al. 2002). Situação similar foi descrita para o brometo de etídeo, em que ocorrem sítios secundários de ligação ao DNA, os quais a droga se liga com menor afinidade somente quando certa fração dos sítios de ligação primária tiver sido preenchida. Esse primeiro nível (intercalar) de interação ao DNA resultaria em um complexo com uma molécula da droga para cada 4-5 pares de base; enquanto após o segundo nível (interações hidrofóbicas), esse complexo passaria para a proporção de aproximadamente 1:1 (Waring 1965). Outro aspecto interessante é que o brometo de etídeo demonstrou maior interação com o DNA supercoil do que com seu estado desenovelado (Waring 1968).

O brometo de etídeo e o iodeto de propídeo interagem com a dupla hélice de DNA de forma análoga (Kim et al. 2002). Essa situação de menor afinidade desses corantes fluorescentes intercalares com o DNA desenovelado deve ser similar às regiões eucromáticas que se apresentam parcialmente degradadas após o bandamento C. Isso poderia explicar o fato de que o segundo nível de interação (hidrofóbicas) com o DNA não deve ocorrer nessas porções degradadas, ou ocorre em menor proporção (eucromatina). É sabido que esses fluoróforos quando intercalados a molécula de DNA apresentam valores de absorbância inferiores do que quando tais drogas se encontram no seu estado livre (Waring 1965; Waring 1968). Assim, essas moléculas fluorescentes margeando a cromatina (livres/interações hidrofóbicas), aumentariam a

absorbância das regiões heterocromáticas em relação às eucromáticas. Isto explicaria o maior contraste obtido entre heterocromatina e eucromatina com a utilização do iodeto de propídeo após o bandamento C. Além disso, sabe-se que a ligação de alguns corantes, e.g., brometo de etídeo, acridina laranja, azul de metileno, aumenta muito sua intensidade de fluorescência (Wahl et al. 1970; Olmsted III e Kearns 1977; Bresloff e Crothers 1981; Nafisi et al. 2007); entretanto, nenhuma explicação sobre o processo que produz este contraste tem sido feita. Desta forma, a utilização do iodeto de propídeo pode ser considerada pertinente em grupos de animais ou plantas que apresentem baixo contraste entre a eucromatina e a heterocromatina quando corados por Giemsa.

Agradecimentos

Os autores são gratos aos órgãos de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 09/15780-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES proc. 083/2007). Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pelo apoio de coleta.

Referências Bibliográficas

- Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1989) Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods in Cell Biology* 30: 417-448.
- Arrighi FE, Hsu TC (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
- Barros e Silva AE, Guerra M (2010) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry* 85 (2): 115-125.

- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. *Journal of Fish Biology* 75: 2313-2325.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 2: 103–120.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O (2010) Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. *Neotropical Ichthyology* 8(2): 361-368.
- Bresloff JL, Crothers DM (1981) Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions. *Biochemistry* 20: 3547-3553.
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR, *The Evolution of the Genome*, Elsevier, San Diego, CA, 223-286.
- Castiglia R, Garagna S, Merico V, Oguge N, Corti M (2006) Cytogenetics of a new cytotype of African *Mus* (subgenus *Nannomys*) *minutoides* (Rodentia, Muridae) from Kenya: C- and G- banding and distribution of (TTAGGG)*n* telomeric sequences. *Chromosome Research* 14: 587-594.
- Catarino S, Alvarez E, Campa A, Vieira R, Roca A, Giraldez R (2006) Identification and physical mapping of induced translocation breakpoints involving chromosomes 1R in rye. *Chromosome Research* 14: 755-765.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2002) A ZZ/ZW sex chromosomes system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55: 139-150.
- Chandley AC, Fletcher JM (1973) Centromere staining at meiosis in man. *Humangenetik* 18: 247-252.
- Comings DE (1978) Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Annual Review of Genetics* 12: 25-46.

- Dillon N (2004) Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell* 96: 631-637.
- Fedoroff N (2000) Transposons and genome evolution in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 97: 7002-7007.
- Fregonezi JN, Fernandes T, Torezan JMD, Vieira AOS, Vanzela ALL (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology* 29: 97-104.
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9: 365-384.
- Gold JR, Amemiya CT, Ellison JR (1986) Chromosomal heterochromatin differentiation in North American Cyprinid Fishes. *Cytologia* 51: 557-566.
- Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology* 37: 563-575.
- Hennig W (2004) The revolution of the biology of the genome. *Cell Research* 14: 1-7.
- Holmquist G (1979) The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. *Chromosoma* 72: 203-224.
- Jack EM, Harrison CJ, Allen TD, Harris R (1985) The structural basis for C-banding. A scanning electron microscopy study. *Chromosoma* 91: 363-368.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* 33: 102-106.
- Kawagoshi T, Nishida C, Ota H, Kumazawa Y, Endo H, Matsuda Y (2008) Molecular structures of centromeric heterochromatin and karyotypic evolution in the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) (Crocodylidae, Crocodylia). *Chromosome Research* 16: 1119-1132.

- Kim ES, Punina EO, Rodionov AV (2002) Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russian Journal of Genetics* 38: 489-496.
- Koehler MR, Dehm D, Guttenbach M, Nanda I, Haaf T, Molina WF, Galetti Jr. PM, Schmid M (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chromosome Research* 5: 12-22.
- Kongsuwan K, Smyth DR (1978) DNA Loss during C-Banding of Chromosomes of *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 68: 59-72.
- Kuipers AGJ, van Os DPM, Hans de Jong J, Ramanna MS (1997) Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin. *Chromosome Research* 5: 31-39.
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho (2010) Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 648-656.
- Macaisne N, Dutrillaux AM, Dutrillaux B (2006) Meiotic behaviour of a new complex X-Y-autosome translocation and amplified heterochromatin in *Jumnos ruckeri* (Saunders) (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae). *Chromosome Research* 14: 909-918.
- Marky LA, Macgregor Jr RB (1990) Hydration of dA.dT polymers: role of water in the thermodynamics of ethidium and propidium intercalation. *Biochemistry* 29: 4805-4811.
- Martinez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Silva LF, Venere PC, Souza IL, Moreira-Filho O (2011) Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia* 64: 121-128.
- Mazzini G, Giordano P, Riccardi A, Montecucco M (1983) A flow cytometric study of the propidium iodide staining kinetics of human leukocytes and its relationships with chromatin structure. *Cytometry* 3: 443-448.

- Meisner LF, Chuprevich TW, Inhorn SL, Johnson CB (1974) Dye-nucleoprotein interactions in Giemsa banding. *The Journal of Cell Biology* 61: 248-252.
- Molina WF, Schmid M, Galetti Jr PM (1998) Heterochromatin and sex chromosomes in the neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94: 141-149.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM (1993) Distribution of sex chromosomes mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125.
- Muller W, Crothers DM (1975) Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *European Journal of Biochemistry* 54: 267-277.
- Nafisi S, Saboury AA, Keramat N, Neault JF, Tamijir-Riachi HA (2007) Stability and structure features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure* 827: 35-43.
- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108: 211-215.
- Oliveira C, Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research* 6: 205-211.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 81-100.
- Olmsted III J, Kearns DR (1977) Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* 16: 3647-3654.
- Pardue ML, Gall JG (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
- Pardue ML, Hennig W (1990) Heterochromatin: junk or collectors item? *Chromosoma* 100: 3-7.

- Peterson DG, Lapitan NLV, Stack SM (1999) Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics* 152: 427-439.
- Ren J, Jenkins TC, Chaires JB (2000) Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* 39: 8439-8447.
- Rocchi A (1982) On the heterogeneity of heterochromatin. *Caryologia* 35: 169-189.
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP (2006) Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosomes system. *Genetica* 128: 159-166.
- She CW, Liu JY, Song YC (2006) CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. *Biotechnic & Histochemistry* 81: 13-21.
- Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature (New Biology)* 232: 31-32.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sumner AT (1990) Chromosome banding. London: Unwin-Hyman.
- Sumner AT (2003) Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing, London, 24-132.
- Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD (1992) DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103-3112.
- Treco FR, Malabarba LR, Giuliano-Caetano L, Dias, AL (2008) Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6 (1): 87-92.

- van Duijn P, van Prooijen-Knegt AC, van der Ploeg M (1985) The involvement of nucleosomes in Giemsa staining of chromosomes. A new hypothesis on the banding mechanism. *Histochemistry* 82: 363-376.
- Vosa CG (1976) Heterochromatin classification in *Vicia faba* and *Scilla sibirica*. *Chromosomes Today* 5: 185-192.
- Wahl PH, Paoletti J, Le Pecq JB (1970) Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex evidence for an internal motion in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 65: 417-421.
- Waring MJ (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* 13: 269-282.
- Waring MJ (1968) Drugs which affect the structure and function of DNA. *Nature* 219: 1320-1325.
- Yunis JJ, Yasmineh WG (1971) Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. *Science* 174: 1200-1209.
- Zuckerandl E, Hennig W (1995) Tracking heterochromatin. *Chromosoma* 104: 75-83.

Figura

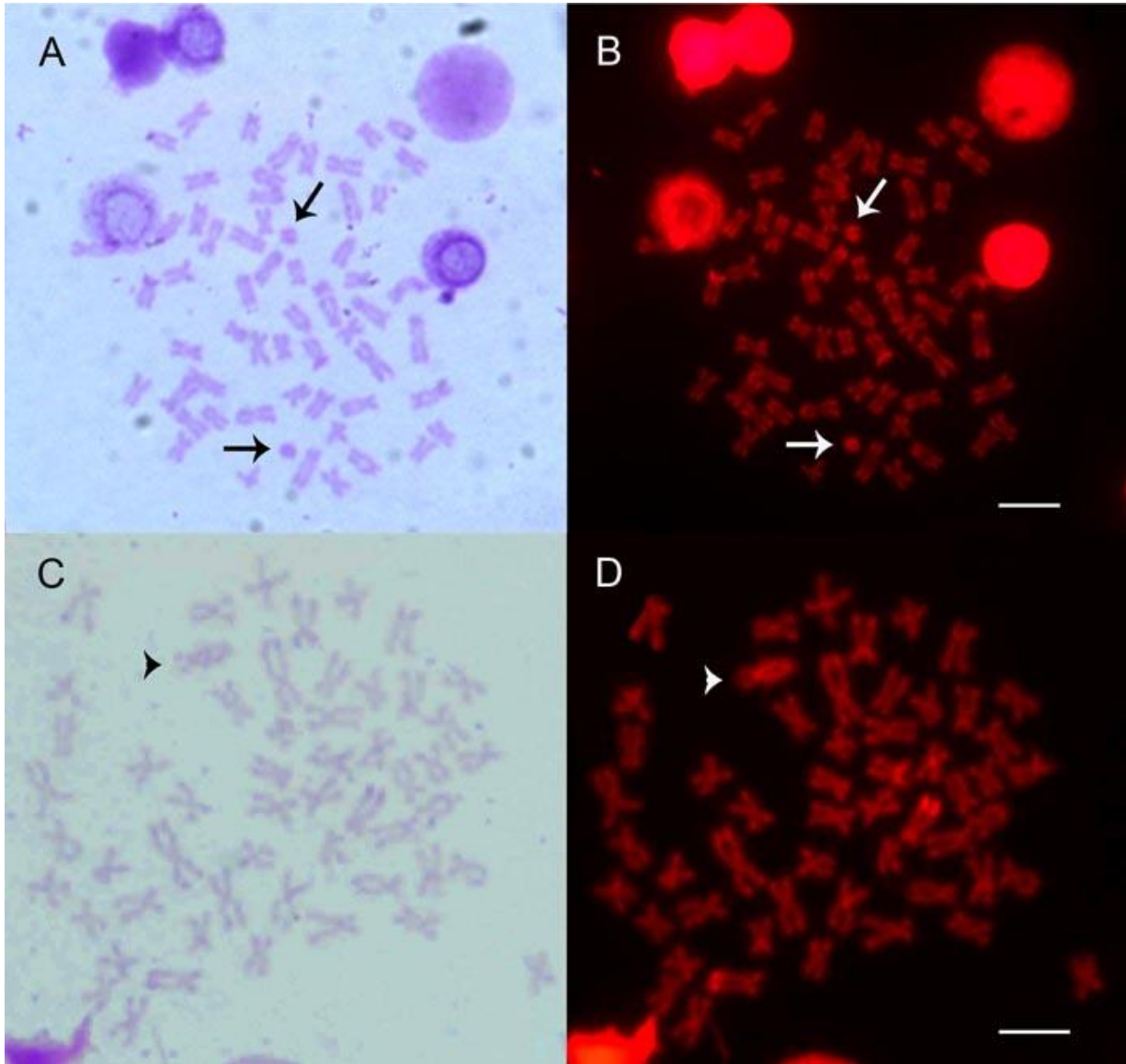


Figura 1 Metáfases C-bandadas dos peixes neotropicais, *Parauchenipterus galeatus* (A, B) e *Apareiodon vladii* (C, D) coradas convencionalmente com Giemsa (A, C) e com o fluoróforo, iodeto de propídeo (B, D). As setas e as cabeças de seta indicam os cromossomos B de *P. galeatus* (A, B) e o cromossomo W de *A. vladii* (C, D), respectivamente. Barras = 5 μ m.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família Auchenipteridae é um grupo ainda pouco estudado do ponto de vista genético. Com o objetivo de contribuir com o conhecimento relacionado a esta família, tentando auxiliar não só nas problemáticas evolutivas, mas também nas de ordem taxonômica, é resumido a seguir alguns aspectos de maior relevância.

O gênero *Ageneiosus* pode ser considerado o que apresenta não só a maior diferença cromossômica em relação aos outros gêneros estudados, mas também o que parece apresentar a maior variabilidade relacionada ao número diplóide. Vale lembrar que, *Ageneiosus* é o único com espécies que apresentam número diplóide diferente de 58, como encontrado para todas as outras espécies da família, sendo que a espécie deste trabalho apresentou 56 cromossomos. Além disso, foi detectado resquícios de sequência telomérica intersticial (ITS) no primeiro par metacêntrico do cariótipo, cromossomo este que é facilmente distinguível e que não é encontrado em nenhuma outra espécie de Auchenipteridae. De maneira geral, *Ageneiosus* parece apresentar uma organização genômica um pouco diferente quando comparada com as outras espécies de Auchenipteridae. Além disso, o ITS indica que uma fusão cromossômica originou o primeiro par metacêntrico em *A. inermis*, rearranjo que pode ser um evento basal para o gênero.

No tocante aos cromossomos B, recentemente foi feito o primeiro relato em Auchenipteridae. Neste trabalho, foi descoberta uma segunda espécie apresentando estes cromossomos adicionais, sendo esta do gênero *Trachelyopterus*, a qual é considerada por dados morfológicos grupo-irmão de *Parauchenipterus*. Devido a essa proximidade filogenética, os cromossomos B dessas duas espécies foram analisados com metodologias citogenéticas clássicas e moleculares, e um conjunto de características pode ser observada como compartilhada entre eles. Os cromossomos B de *P. galeatus* e *Trachelyopterus* sp. se apresentam pequenos, metacêntricos, totalmente heterocromáticos, com variação intra e

interindividual. Além disso, de forma intrigante e pela primeira vez em peixes, a sequência telomérica [TTAGGG]_n se mostrou amplificada nos cromossomos B das duas espécies. As repetições [GATA]_n se apresentaram espalhadas em todos os cromossomos do complemento A, entretanto, não presente nos cromossomos B, sendo este resultado também igual para as duas espécies. Todos esses aspectos confirmam a grande proximidade filogenética entre os gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, além disso, sugerem a hipótese de que os cromossomos B das duas espécies possam apresentar origem comum, anterior à diversificação desses gêneros.

Com relação ao gênero *Tatia*, nenhum estudo cromossômico havia sido realizado até o momento, e neste trabalho foi realizada análise em duas das três espécies pertencentes à bacia do Prata. De maneira geral, pode se destacar algumas diferenças encontradas nas duas espécies quando comparadas as outras de Auchenipteridae, como fórmula cariotípica (ausência de acrocêntricos), distribuição da heterocromatina, e número de sítios de rDNA 5S. Conforme esperado, as duas espécies de *Tatia* apresentaram grande similaridade para os marcadores analisados, além disso, como citado acima, apresentaram algumas características que, até o momento, parecem ser intrínsecas deste gênero.

A análise de uma população de *G. ribeiroi* pertencente ao trecho final da bacia do rio Iguazu possibilitou comparar com os dados previamente existentes para outras populações deste mesmo sistema hidrográfico, o que forneceu valiosa informação a respeito de diferenças genéticas entre essas populações. Alguns marcadores cromossômicos ainda não utilizados nos estudos prévios foram aplicados nessa população. Por fim, os dados possibilitaram concluir que devido à acidentada topografia dessa bacia, as populações de *G. ribeiroi* parecem estar fragmentadas, o que faz com que cada população represente um patrimônio genético único.

Uma pequena contribuição à técnica de bandamento C foi realizada neste trabalho, que ocorre através da mudança do corante não-fluorescente comumente utilizado Giemsa,

pelo corante fluorescente iodeto de propídeo. Nossos dados mostram que a alteração por este corante gera maior contraste, o que pode ser valioso para espécies que apresentem heterocromatinas pálidas. Aspectos relacionados ao processo de interação desses dois corantes com a molécula de DNA e de excitação do corante fluorescente quando irradiado com a luz ultravioleta foram discutidos.

Anexo I

Análise cromossômica e do DNA mitocondrial de espécies de dois gêneros de Auchenipteridae: uma contribuição para a taxonomia de *Parauchenipterus*

Este trabalho está em elaboração.

Introdução

Auchenipteridae, que é restrita a região Neotropical, compreende 20 gêneros e cerca de 90 espécies (Ferraris Jr., 2007) das quais 74 já foram registradas para o território brasileiro (Akama e Sarmiento-Soares, 2007). Segundo Ferraris Jr (2003) esse grupo é dividido em duas subfamílias, Centromochlinae e Auchenipterinae. Centromochlinae inclui somente os gêneros *Centromochlus*, *Gelanoglanis*, *Glanidium* e *Tatia*, enquanto Auchenipterinae compreende os outros 16 gêneros.

A taxonomia de *Parauchenipterus* é historicamente confusa e tem problemas desde a sua criação (Akama, 2004). Esse gênero já foi considerado sinonímia de alguns gêneros de Auchenipteridae e posteriormente revalidado por vários autores durante a história. Mais recentemente, essa discussão gira em torno do gênero *Trachelyopterus*, havendo trabalhos que tratam *Parauchenipterus* sinônimo de *Trachelyopterus* (Ferraris Jr 2003; Ferraris Jr 2007), e outros que consideram *Parauchenipterus* válido (Akama 2004; Buckup et al. 2007; Graça e Pavanelli 2007). O único trabalho que focou especificamente esta problemática foi o de Akama (2004), sendo que os outros são apenas catálogos de espécies referentes a determinadas regiões. Após a revisão de Akama (2004), *Parauchenipterus* passaria a ser considerado válido abrangendo cinco espécies (*P. galeatus*, *Parauchenipterus* sp., *P. ceratophysus*, *P. porosus* e *P. striatulus*), e *Trachelyopterus* passaria a abranger 2 espécies (*T. coriaceus* e *Trachelyopterus* sp.), sendo que tal análise foi baseada em apenas caracteres morfológicos. Este trabalho está sendo desenvolvido com o objetivo de contribuir na resolução dessa problemática, utilizando marcadores genéticos, tanto cromossômicos quanto de sequências de DNA mitocondrial,.

Materiais e Métodos

Foi realizada análise cromossômica em cinco populações de *P. galeatus*, sendo 6 exemplares (3 machos e 3 fêmeas) de uma lagoa marginal ao rio São Francisco, município de Lagoa da Prata (MG) (19° 56' 15,1" S; 45° 32' 13,8" O); 6 exemplares (3 machos e 3 fêmeas) da

lagoa dos Tropeiros, bacia do rio Piumhi, município de Capitólio (MG) (20° 33' 99,3" S; 46° 03' 21,6" O); 6 exemplares (3 machos e 3 fêmeas) do reservatório de Jupuíá, rio Paraná, município de Três Lagoas (MS) (20° 44' 60,3" S; 51° 39' 10,5" O); 11 exemplares (4 machos e 7 fêmeas) da lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT) (16° 25' 40,9" S; 56° 25' 07,4" O); e 19 exemplares (9 machos e 10 fêmeas) da lagoa marginal ao córrego do Medo (Fazenda Ana Maria), afluente do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO) (13° 08' 52,7" S; 50° 25' 02,8" O). Também foi realizada análise cromossômica em 12 exemplares (7 machos e 5 fêmeas) de *P. striatulus* da lagoa Verde, bacia do rio Doce, município de Marliéria (MG) (19° 49' 44,5" S; 42° 37' 52,5" O); 15 exemplares de *T. coriaceus* da lago marginal ao córrego do Medo (Fazenda Ana Maria), afluente do rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia (GO) (13° 08' 52,7" S; 50° 25' 02,8" O); e, *Trachelyopterus* sp. da lagoa Arrombado, bacia do rio Bento Gomes, afluente do rio Cuiabá, município de Poconé (MT) (16° 25' 40,9" S; 56° 25' 07,4" O).

Os exemplares de *P. galeatus* da lagoa dos Tropeiros e do reservatório de Jupuíá foram depositados na coleção de peixes do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUP 8613 e NUP 8614, respectivamente). Os exemplares das outras três populações de *P. galeatus* (lagoa da Prata, lagoa Arrombado e córrego do Medo), *P. striatulus*, *T. coriaceus* e *Trachelyopterus* sp. foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 100985, MZUSP 110804, MZUSP 109793, MZUSP 109798, MZUSP 106766, MZUSP 110806).

A preparação das suspensões celulares de cromossomos mitóticos foi obtida de células do rim anterior (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1993) e classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a razão de braços (Levan et al. 1964). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão

heterocromático foi determinado através da metodologia descrita por Sumner (1972) com modificações (Lui et al. 2012). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram identificadas utilizando o método descrito por Howell e Black (1980). Ambas as metodologias foram aplicadas sequencialmente, após a coloração convencional dos cromossomos por Giemsa (análise seqüencial).

As hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) foram realizadas segundo Pinkel et al. (1986), usando as sondas de rDNA 18S (Hatanaka e Galetti Jr 2004), rDNA 5S (Martins et al. 2000). A sonda de rDNA 18S foi marcada com biotina-16-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Biotin Nick Translation Mix - Roche). A sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP por nick translation de acordo com as instruções do fabricante (Dig 11 Nick Translation Mix - Roche). As sequências [TTAGGG]_n e [GATA]_n foram marcadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando biotina-16-dUTP (Roche Applied Science). Todas as hibridizações foram realizadas com 77% de estringência (200 ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano, 2xSSC; pH 7.0 – 7.2). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51. O software DP2-BSW (Olympus) foi utilizado para a captura das imagens.

Para as análises moleculares em que foi realizado o sequenciamento de parte dos genes citcromo B e citcromo oxidase I foram utilizados 6 exemplares de cada uma das populações, sendo sempre 3 machos e 3 fêmeas. Além das oito populações acima citadas referente aos gêneros *Parauchenipterus* e *Trachelyopterus*, foi feito o sequenciamento de cada um desses mesmos genes (citicromo B e citcromo oxidase I) de um exemplar das espécies *Ageneiosus inermis*, *Glanidium ribeiroi*, *Tatia jaracatia*, *Trachycorystes trachycorystes*, e *Pterodoras granulatus*, visando a utilização com grupo-externo, para enraizamento da árvore que será gerada.

O DNA total foi isolado de porções de fígado preservados em etanol 100% e extraído com fenol através de método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a extração do DNA total

foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras. Depois da quantificação, uma alíquota do DNA foi diluída a fim de se obter uma concentração final de 50 ng/μL para uso diário.

Para amplificação de parte do gene Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial foram utilizados os primers FISHF1 (5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3') e FISHR1 (5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3') (Ward *et al.* 2005). Essa região foi amplificada através de uma reação de PCR contendo 2,5 μL de tampão de reação 10X, 0,65 μL MgCl₂ (50mM), 4,0 μL dNTP Mix (1,25 mM), 1,0 μL de cada primer (10 μM), 2 μL DNA (50 ng/μL), 0,2 μL Taq Polimerase (5 U/μL) e 13,65 μL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C (2 minutos), 36 ciclos de 94°C (30 segundos), 54°C (30 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (10 minutos).

Para amplificação de parte do gene Citocromo B do DNA mitocondrial foram utilizados os primers CytBL (5' AAY ATC TCY GCA TGA TGA AA 3') e CytBH (5' TCT TCG GAT TAC AAG ACC G 3'). Essa região foi amplificada através de uma reação de PCR contendo 5,0 μL de tampão de reação 10X, 1,5 μL MgCl₂ (50mM), 8,0 μL dNTP Mix (1,25 mM), 2,0 μL de cada primer, 2 μL DNA (50 ng/μL), 0,4 μL Taq Polimerase e 27,1 μL de H₂O Mili-Q. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C (4 minutos), 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53°C (90 segundos), 72°C (1 minuto), seguido por 72°C (5 minutos).

Os produtos de amplificação de ambos os genes citados acima foram submetidos à purificação com PEG 8000 (Polietileno Glicol) (Sambrook *et al.* 2000), afim de retirar os componentes da PCR que poderiam interferir na qualidade do sequenciamento destes produtos. Para isso, foi adicionado 25 μL de solução PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao produto de PCR (volume/volume), o qual foi incubado em estufa por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3900 x g (4000 rpm) durante 30 minutos e todo o

sobrenadante foi, delicadamente, descartado. Foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado nos pellets de produto de PCR que ficaram em cada um dos microtubos; em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 3900 x g por 30 minutos e retirou-se o etanol, cuidadosamente. Este passo foi realizado mais uma vez e as amostras foram colocadas para secagem em estufa a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 µL de água ultrapura autoclavada e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente overnight para a total eluição dos pellets.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. As corridas foram feitas em capilares de 36 centímetros utilizando o polímero POP7. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador ABI 3730 DNA Analyser da Applied Biosystems. As seqüências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Resultados

Os resultados das análises cromossômicas estão em fase conclusiva, faltando alguns ajustes e os resultados parciais estão apresentados na Tabela 1. As análises referentes ao seqüenciamento de parte dos genes citocromo B e citocromo oxidase I do DNA mitocondrial foram parcialmente executadas, sendo que o seqüenciamento já foi obtido, entretanto a fase de edição das seqüências está sendo realizada, faltando fazer o alinhamento e posteriormente as análises de agrupamento. Após a conclusão desses resultados eles serão utilizados na elaboração de um trabalho que objetiva contribuir com a discussão referente à problemática taxonômica desse grupo de peixes e até mesmo questionar sobre a validade do gênero *Parauchenipterus*.

Tabela 1 Resumo dos dados cromossômicos e dos genes do DNA mitocondrial das espécies *P. galeatus*, *P. striatulus*, *Trachelyopterus* sp. e *T. coriaceus*.

Espécie	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Cromossomos B	Ag-RONs/ rDNA 18S	rDNA 5S	Citocromo Oxidase I	Citocromo B
<i>Parauchenipterus galeatus</i> Lagoa da Prata (bacia do rio São Francisco, MG)	58	108	22m + 16sm + 12st + 8a	Presente (0 a 2)	par 23, p, st	par 16, p, sm par 17, q, sm	X	X
<i>Parauchenipterus galeatus</i> Lagoa dos Tropeiros (bacia do rio Piumhi, MG)	58	108	20m + 16sm + 14st + 8a	Ausente	par 24, p, st	par 15, p, sm par 16, q, sm	X	X
<i>Parauchenipterus galeatus</i> Reservatório de Jupιά (bacia do rio Paraná, MS)	58	108	24m + 18sm + 8st + 8a	Ausente	par 25, p, st	par 16, p, sm par 17, q, sm	X	X
<i>Parauchenipterus galeatus</i> Lagoa Arrombado (bacia do rio Cuiabá, MT)	58	108	24m + 20sm + 6st + 8a	Ausente	par 17, p, sm	par 18, p, sm par 19, q, sm	X	X
<i>Parauchenipterus galeatus</i> Lagoa do córrego do Medo (bacia do rio Araguaia, GO)	58	108	28m + 16sm + 6st + 8a	Ausente	par 18, p, sm	par 3, p, m	X	X
<i>Parauchenipterus striatulus</i> Lagoa Verde (bacia do rio Doce, MG)	58	110	18m + 22sm + 12st + 6a	Ausente	par 25, p, st	par 10, p, sm par 13, q, sm par 15, q, sm	X	X

<i>Trachelyopterus coriaceus</i>								
Lagoa do córrego do Medo (bacia do rio Araguaia, GO)	58	108	20m + 20sm + 10st + 8a	Ausente	par 14, p, sm	par 3, p, m par 17, q, sm	X	X
<i>Trachelyopterus</i> sp.								
Lagoa Arrombado (bacia do rio Cuiabá, MT)	58	108	22m + 20sm + 8st + 8a	Presente (0 a 3)	par 22, p, st	par 16, q, sm par 18, q, sm	X	X

GO – Goiás; MG – Minas Gerais; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; p=braço curto; q=braço longo; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico.

Referências Bibliográficas

- Akama A (2004) *Sistemática dos gêneros Parauchenipterus Bleeker, 1862 e Trachelyopterus Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 375p.
- Akama A, Sarmiento-Soares LM (2007) Família Auchenipteridae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (eds) *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, 116-120.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 2: 103–120.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, 195 p.
- Ferraris Jr CJ (2003) Family Auchenipteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. (eds RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris Jr) Edipucrs. Porto Alegre, 470-482.
- Ferraris Jr CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Foresti, F, Oliveira, C, Almeida-Toledo, LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* 49, 810-813.
- Graça, WJ, Pavanelli, CS (2007) Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, 241 p.
- Hatanaka T; Galetti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.

- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36, 1014-1015.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52, 201-220.
- Lui RL, Blanco DR, Moreira-Filho O, Margarido VP (2012a) Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 433-438.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 133:39-46.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 83: 2934–2938.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Segunda edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 360: 1847-1857.