



DANIELE APARECIDA MATOSO

**CONTRIBUIÇÃO À CONSERVAÇÃO GENÉTICA
DO PEIXE SURUBIM (TELEOSTEI:
Steindachneridion)**

**Curitiba
2009**

DANIELE APARECIDA MATOSO

**CONTRIBUIÇÃO À CONSERVAÇÃO GENÉTICA DO
PEIXE SURUBIM (TELEOSTEI: *Steindachneridion*)**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas área de
concentração: Genética.**

**Orientador: Dr. Roberto Ferreira
Artoni**

**Co-orientadora: Dr^a Marta
Margarete Cestari**

Curitiba

2009

*Dedico esse trabalho a todas
as pessoas que têm em si a
inquietação da incerteza e o
desejo pela verdade.*

O desenvolvimento da ciência e das atividades criativas do espírito exige uma liberdade que consiste na independência do pensamento em relação às restrições do preconceito autoritário e social, e isso exige cultivar mentes livres e espíritos livres; um espírito de tolerância. O fundamento da tolerância é a humildade – a convicção de que ninguém tem o direito de impor ideias e crenças aos outros.

Albert Einstein

Se não podemos pensar por nós mesmos, se não estamos dispostos a questionar a autoridade, somos apenas massa de manobra nas mãos daqueles que detêm o poder. Mas, se os cidadãos são educados e formam as suas próprias opiniões, aqueles que detêm o poder trabalham para nós. Em todo país, deveríamos ensinar às nossas crianças o método científico e as razões para uma Declaração de Direitos. No mundo assombrado por Demônios que habitamos em virtude de sermos humanos, talvez seja apenas isso o que interpõe entre nós e a escuridão circundante.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas que participaram na elaboração e desenvolvimento desse trabalho e que, portanto contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

- Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado;

- Ao professor Dr. Roberto Ferreira Artoni, meu orientador científico, agradeço pela confiança depositada em todos os momentos inclusive nos críticos, pelas conversas reanimadoras, pela sua visão de mundo inspirada em desafios, pela sua simplicidade em enxergar verdades escondidas e por sua pessoa.

- A todos os professores do Departamento de Genética e aos membros do Colegiado do Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná que me propiciaram a possibilidade de desenvolver esse trabalho; agradeço especialmente aos professores Dr. João Carlos Magalhães Marques, Dr^a Marina de Almeida e Dr^a Chirlei Glienke;

- À professora Dr^a Marta Margarete Cestari que me recebeu calorosamente em seu laboratório;

- Aos colegas que participaram comigo das disciplinas obrigatórias;

- Aos colegas do laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná, em especial à querida amiga Dr^a Maria Cristina da Silva Cortinhas;

- Às colegas Danyelle Stringary, Danielle Ferreira Malheiros e Virgínia Coser pelas conversas divertidas nos corredores da Federal;

- Aos professores Dr Marcelo Ricardo Vicari, Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, Dr^a Viviane Nogarotto Vicari, pela ajuda na bancada, críticas e sugestões no trabalho;

- Ao Professor Dr^o Francisco Fanucchi pelo empréstimo do fotodocumentador de imagens;

- Aos professores Dr^a Íris Hass e Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, pelas dicas com os marcadores RAPD, pelo entusiasmo e apoio nas conversas relatando suas experiências profissionais;

- Aos membros da banca pela valiosa contribuição ao trabalho, críticas sugestões;
- Ao técnico do Laboratório de Citogenética da UEPG, Miguel Airton de Carvalho pela ajuda nas coletas e pela exímia direção do laboratório e a Zoli nossa prestativa, competente e bem humorada secretária;
- Aos colegas do laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela maravilhosa e saudabilíssima convivência, agradeço pelos momentos de risada e descontração e por fazerem do nosso ambiente de trabalho um lugar harmonioso, um reduto de potencialidades inusitadas, onde encontrei personalidades criativas, inteligentes e competentes, um beijo e muito obrigada a vocês: Carol e Paulo Svidinicki, Carolina, Tatiana, Edemar, Danizinha, Cléberon, Leonardo, Bárbara, Jonathan, Ronaldo, João Felipe, Helena, Michelli, e a Maelin, meu anjo da guarda nessa fase final do trabalho e Neto meu adorador amigo;
- Aos colegas do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA;
- Ao Carlos e Cláudia pela hospedagem em Manaus, e a Leandra e Igor que me acompanharam nessa jornada fazendo com que me sentisse em casa;
- Quero agradecer a minha família colateral por fornecerem e compartilharem comigo o conforto de seus lares e me envolverem de carinho e entusiasmo, esse agradecimento vai especialmente aos primos Elza, Josemar, Rodrigo, Mariane, Régis, Moisés, Luisa Vitória, João Vítor, Ana Carolina e André e aos meus tios Rosane e Jorci.
- Finalmente quero agradecer a minha família pelo amor que tenho recebido.

RESUMO

Steindachneridion é um gênero endêmico das bacias hidrográficas brasileiras do leste, são peixes que possuem corpo coberto por couro e apresentam grande variação no tamanho e na cor e nenhum dimorfismo sexual. A revisão mais recente do gênero foi realizada por Júlio César Garavello em 2005, que sugeriu a ocorrência de seis espécies: *S. amblyurum* endêmica do Rio Jequitinhonha, *S. doceanum* endêmica do Rio Doce, *S. parahybae* endêmica do Rio Paraíba do Sul, *S. melanodermatum* endêmica do Rio Iguaçu, *S. scriptum* e *S. punctatum* com maior distribuição na bacia do Paraná. No presente trabalho foram aplicadas ferramentas da citogenética clássica e molecular em *S. melanodermatum* na tentativa de averiguar a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais tipo XX/XY nessa espécie, além disso, foram aplicados marcadores moleculares RAPD para verificar o nível de similaridade genética e heterozigose em estoque reprodutor e cultivado. Análises de segmentos de mtDNA da região D-Loop também foram realizadas em *S. melanodermatum*, *S. parahybae*, *S. scriptum*, *S. doceanum*, *Sorubim lima* e *Zungaro zungaro*. Os resultados indicaram a ocorrência de polimorfismos cromossômicos na espécie *S. melanodermatum* relacionados a um heteromorfismo das regiões organizadoras de nucléolo e outro polimorfismo envolvendo dois cromossomos submetacêntricos do complemento. A similaridade genética foi encontrada com menor amplitude de variação e relativamente maior quando comparada à espécie *S. scriptum*. A heterozigose no estoque analisado não está comprometida. Relações evolutivas entre as espécies foram estabelecidas e um cenário filogeográfico foi proposto. As informações aqui levantadas contribuirão para o reconhecimento das tendências, padrões e processos evolutivos ocorrentes nessas espécies.

ABSTRACT

Steindachneridion is an endemic genus from hydrographic basins of east Brazilian, are hide fish that change in length and colour and show little sexual dimorphism. The more recent review of genus was performed by Júlio Cesar Garavello at 2005, which suggested the occurrence of six species: *S. amblyurum* endemic from Jequitinhonha River, *S. doceanum* endemic from Doce River, *S. parahybae* endemic from Paraíba do Sul River, *S. melanodermatum* endemic from Iguaçu River, *S. scriptum* and *S. punctatum* with greater distribution in Paraná Basin. In this work were applied molecular and classical cytogenetical tools on *S. melanodermatum* to verify the occurrence of a sexual chromosomal system XX/XY in this species, furthermore, were applied molecular markers RAPD to verify the genetic similarity and heterozygosity in spawners and cultured stock. Segments of mtDNA D-Loop region were also analyzed on *S. melanodermatum*, *S. parahybae*, *S. scriptum*, *S. doceanum*, *Sorubim lima* and *Zungaro zungaro*. The results indicated the occurrence of chromosomal polymorphisms in *S. melanodermatum* related to nucleolus organizers regions and another involving two submetacentric chromosomes of complement. The similarity genetic ranged between 0,57 and 0,95. The heterozygosity in the stock analyzed is high.

Evolutionary relationships among the species were established and a phylogeographic scenario was proposed. The informations of this study contributed for the characterization of tendencies and evolutionary process in these species.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1.1 – Organização do genoma mitocondrial de vertebrados31

Figura 1.2 – Distribuição pelo território brasileiro de todas as espécies descritas de *Steindachneridion*, segundo J. C. Garavello (2005)34

Figura 1.3 – Exemplos do gênero *Steindachneridion*. a) *S. parahybae*, b) *S. doceanum*, c) *S. scriptum*, d) *S. melanodermatum*. (créditos J. C. Garavello, 2005)35

Capítulo II

Figura 2.1 – (a) Exemplar de *Steindachneridion melanodermatum*. Caracterização sexual pela observação de tecido gonadal, (b) macho e (c) fêmea. Barra = 10 μ m..... 68

Figura 2.2 – Cariótipos de *S. melanodermatum*. (a, b) fêmea e macho com o polimorfismo. (c, d) fêmea e macho sem o polimorfismo. Observar a diferença acentuada de tamanho nos cromossomos submetacêntricos 9 e 14 nos exemplares com polimorfismo. Barra = 10 μ m 69

Figura 2.3 – Análise convencional de células meióticas de fêmea e macho de *S. melanodermatum*. (a-f) células de fêmea. (a) células em processo sincrônico de condensação no estágio de zigóteno tardio (abaixo) e paquíteno inicial (acima), (b) 28 cromossomos paquitênicos pareados ponta a ponta, (c) desenho esquemático sobre a imagem anterior do paquíteno, (d) diplóteno tardio (seta), (e) diacinese com visualização de quiasmas (seta), (f) fase de transição do diplóteno para a diacinese com a visualização de quiasmas (seta), (g – i) células de macho. (g) diplóteno, (h, i) diacinese com visualização de quiasmas (setas). Barra = 10 μ m70

Figura 2.4 – (a) Cariótipo de exemplar macho sem o polimorfismo. Giemsa (acima) e banda C (abaixo). (b) Cariótipo de exemplar macho com o polimorfismo. Giemsa (acima) e Banda C (abaixo). Barra = 10 μm 71

Figura 2.5 – Metáfase de fêmea evidenciando a localização das regiões 5S em rosa (setas menores) e 18S em verde (setas maiores). As regiões 5S estão presentes no par subtelocêntrico número 19 e as 18S no par acrocêntrico número 25. Observar o heteromorfismo de tamanho das regiões 18S. Barra = 10 μm 72

Figura 2.6 – Localização da região 5S e Ag-RON sequencial. (a, b) fêmea com polimorfismo, (c, d) fêmea sem polimorfismo, (e, f) macho com polimorfismo. Barra = 10 μm 73

Figura 2.7 – Cariótipo de exemplar macho sem polimorfismo após coloração com corante Wright mostrando padrão de bandas semelhantes ao bandamento G. Barra = 10 μm 74

Capítulo III

Figura 3.1 – Fenograma obtido com similaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA para exemplares de *S. melanodermatum*. M= matrizes de reprodução capturadas na natureza..... 85

Figura 3.2 – Padrão de bandas obtido por marcadores RAPD para o *primer* 4 em *S. Melanodermatum* 86

Capítulo IV

Figura 4.1 – Árvore obtida com o método de Parcimônia para exemplares de *S. scriptum* dos Rios Tibagi (TB, 1 a 6) e Uruguai (UR, 7 a 16) e grupo externo (OG, *Brachyplatystoma rousseauxii* 17 e 18, *Zungaro zungaro* 19 e *Sorubim lima* 20) 101

Figura 4.2 – Sequenciamento da região D-loop dos grandes bagres (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Sorubim lima*, *Zungaro zungaro*) mostrando a grande quantidade de *gaps* na porção anterior da sequência nos exemplares de *Steindachneridion scriptum*.....102

Capítulo V

Figura 5.1 – Árvore filogenética obtida pelo método de parcimônia e evolução mínima para oito espécies de grandes bagres. Valores de suporte da análise *bootstrap* para 10.000 replicações, são mostrados acima de cada ramo 115

Figura 5.2 – Árvore filogenética obtida pelo método de parcimônia e evolução mínima para 39 exemplares de *Steindachneridion* e um exemplar de *Zungaro zungaro*. A barra abaixo corresponde ao comprimento dos ramos obtidos por distância genética e equivale a 10% de divergência. Valores de suporte da análise *bootstrap* para os clados principais são mostrados acima dos ramos 116

Capítulo VI

Figura 6.1 – (a) Digestão enzimática por *AluI* do DNA total de *S. melanodermatum* mostrando o padrão em escada do DNA digerido, (b) DNA total autoclavado, (c) DNA tratado com a enzima S1 nuclease após autoclave..... 126

Figura 6.2 – (a) Coloração por DAPI e (b) sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por microdissecção mostrando as regiões terminais marcadas. (c) Coloração por DAPI e (d) sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por *Cot-1*, mostrando as regiões centroméricas e de 18S⁺/AgRON⁺ marcadas (setas).....126

SUMÁRIO

Capítulo I - Introdução Geral - Biologia evolutiva do gênero <i>Steindachneridion</i>.....	14
1. 1 – Caracterização taxônomica e filogenética	14
1. 2 – Distribuição geográfica e biologia reprodutiva	15
1.3 – Estudos citogenéticos na família Pimelodidae	17
1.4 – Estudos citogenéticos no gênero <i>Steindachneridion</i>	22
1.5 – Marcadores moleculares na conservação genética de peixes Neotropicais	23
1.6 – Marcadores moleculares no gênero <i>Steindachneridion</i>	28
1.7 – A molécula de DNA mitocondrial, os estudos evolutivos em peixes e as perspectivas de aplicação em <i>Steindachneridion</i>	29
2 – Objetivos	32
3 – Material e Métodos	33
3.1 – Objeto de estudo e locais de coleta	33
3.2 – Metodologias	36
3.2.1 – Obtenção de metáfases mitóticas.....	36
3.2.2 – Obtenção de metáfases mitóticas – método direto (Bertollo et al., 1978)..	36
3.2.3 – Obtenção de metáfases mitóticas – método indireto <i>in vitro</i> (Fenocchio et al., 1991).....	37
3.2.4 - Método de coloração convencional Giemsa.....	38
3.2.5 – Identificação cromossômica	39
3.2.6 – Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs (Howell e Black, 1980).....	39
3.2.7 – Detecção da heterocromatina - (Sumner, 1972)	40
3.2.8 – Obtenção de padrão similar ao bandamento G pelo corante Wright.....	40
3.2.9 – Coloração pelo fluorocromo DAPI (Schweizer, 1980)	41
3.2.10 – Isolamento de sequencias repetitivas obtidas pela cinética de reassociação do DNA (<i>Coα-1</i>) (Zwick et al., 1997).....	41

3.2.11 – Isolamento de sequencias repetitivas obtidas por microdissecção cromossômica (Hu et al., 1998)/DOP-PCR (Telenius et al., 1992)	42
3.2.12 – Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda de rDNA 18S E 5S (White et al., 1990)	43
3.2.13 – Obtenção de células meióticas para análise da meiose convencional (Kligerman e Bloom, 1977).....	47
3.2.14 – Preparação das lâminas para análise meiótica convencional	47
3.2.15 – Análise dos Marcadores citogenéticos	48
3.2.16 – Extração de DNA – (Sambrook e Russel, 2001)	48
3.2.17 – Extração de DNA – Método CTAB (Murray e Thompson, 1980)	49
3.2.18 – Preparação do gel de agarose 0,8% e 3% para eletroforese e visualização do DNA	50
3.2.19 – Análise molecular baseada em marcadores RAPDs (Williams et al., 1990)	51
3.2.20 – Sequenciamento da região D-loop.....	52
3.3 – Análise estatística dos dados	53
3.3.1 – Marcadores RAPD.....	53
3.3.2 – Sequências D-loop do mtDNA.....	54
Capítulo II – Polimorfismos cromossômicos na espécie <i>Steindachneridion melanodermatum</i> (Siluriformes, Pimelodidae)	59
Capítulo III – Monitoramento da variabilidade genética em plantel selvagem e cultivado de <i>Steindachneridion melanodermatum</i> (Teleostei: Pimelodidae)	76

Capítulo IV – Diferenciação genética em duas populações alopátricas de <i>Steindachneridion scriptum</i>: especiação incipiente ou variação geográfica?	87
Capítulo V – Relações filogenéticas do gênero <i>Steindachneridion</i> pela análise de sequências D-Loop do mtDNA	103
Capítulo VI – Isolamento de DNAs repetitivos por microdissecção cromossômica/ DOP-PCR, digestão enzimática por <i>AluI</i> e <i>Cot-1</i>: investigando a origem dos cromossomos polimórficos 9 e 14 em <i>S. melanoderdatum</i>	117
Conclusões	127
Referências Bibliográficas	130

Capítulo I

Introdução Geral - Biologia evolutiva do gênero *Steindachneridion*

1. 1 – Caracterização taxônomica e filogenética

Segundo LUNDBERG e LITTMANN (2003) os pimelodídeos fazem parte de uma família de peixes neotropicais rica em espécies endêmicas para a América do Sul, com cerca de 90 espécies e 30 gêneros conhecidos. Dentre essas espécies algumas são atualmente reconhecidas e ainda não descritas. Muitos pimelodídeos são carnívoros ou onívoros e consomem grande número de pequenos peixes e invertebrados. Alguns são excelentes predadores como *Brachyplatystoma*, que utiliza estratégia de busca ativa, enquanto outros, a exemplo do *Pseudoplatystoma* são mais sedentários utilizando estratégia de captura do tipo senta e espera. Em diversas regiões do Brasil os pimelodídeos de grande porte são particularmente importantes por constituírem o principal recurso pesqueiro explorado nas comunidades ribeirinhas. Estes são peixes de couro que variam muito em tamanho e coloração, com pouca evidência de dimorfismo sexual. Algumas espécies migram longas distâncias para se reproduzirem e ocupam mais frequentemente ambientes de corredeiras e estão quase ausentes em riachos de montanhas ou florestas (BATISTA e ALVES-GOMES, 2006).

Apesar do monofiletismo da família Pimelodidae ser suportado por caracteres morfológicos, PINNA (1998) argumenta que os grandes bagres (*Sorubim*, *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma*, *Zungaro* e *Steindachneridion*) constituem a maior politomia na filogenia dos pimelodídeos e sua taxonomia em nível genérico ainda necessita de especial atenção da sistemática filogenética.

Na intenção de estabelecer relações filogenéticas mais concretas entre os gêneros de Pimelodidae, alguns autores propuseram a divisão da família em subfamílias como unidades taxonomicamente distintas: Surubiminae, Luciopimelodinae e Callophysinae, (GOSLINE, 1945; GREENWOOD et al., 1966; RINGUELET et al., 1967). Entretanto, LUNDBERG et al., (1991) propuseram a existência de três unidades monofiléticas bem definidas: Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae.

Steindachneridion é um gênero distinto de pimelodídeo do leste do Brasil com relações taxonômicas incertas, mas possivelmente relacionado ao gênero *Zungaro* o qual está amplamente distribuído pelas bacias Amazônica e do Prata (LUNDBERG, 1998).

1. 2 – Distribuição geográfica e biologia reprodutiva

GARAVELLO (2005) fez a revisão mais recente do gênero *Steindachneridion* e comentou sobre as diversas razões pelas quais pouca informação se encontra disponível sobre o grupo, citando principalmente o pequeno número de espécies e as dificuldades de coleta. Segundo esse autor são atualmente reconhecidas seis espécies de *Steindachneridion* distribuídas pelas drenagens costeiras do leste e alto Paraná incluindo o rio Iguaçu. *S. amblyurum* é endêmica para a bacia do rio Jequetinhonha, *S. doceanum* é endêmica para a bacia do rio Doce, *S. parahybae* é endêmica para a bacia do rio Paraíba do Sul, *S. scriptum* e *S. punctatum* possuem uma distribuição mais ampla pelas bacias dos rios Uruguai e Alto Paraná e *S. melanodermatum* é uma espécie endêmica para a bacia do rio Iguaçu.

Duas espécies fósseis são identificadas para o gênero *Steindachneridion*, *S. iheringi* localizada nos campos do Terciário Tremembé no Estado de São Paulo (WOODWARD, 1898) e *S. silvasantosi* dos campos do Terciário da Bacia de Taubaté também no Estado de São Paulo (FIGUEIREDO e COSTA-CARVALHO, 1999). Quanto a sua biologia há uma significativa contribuição feita por NAKATANI et al. (2001) que descreveram diferenças consistentes para a biologia reprodutiva e o desenvolvimento ontogenético de ovos e larvas de *S. scriptum* do rio Paraná e *S. melanodermatum* do rio Iguazu.

Em relação às espécies de *Steindachneridion* ocorrentes nas bacias hidrográficas do Estado do Paraná destacam-se os trabalhos desenvolvidos por AGOSTINHO et al. (1997) que reconhecem a espécie *S. scriptum* como rara na bacia do rio Paraná e altamente vulnerável a alterações ambientais por apresentar hábito migratório com escassez na pesca experimental, comportamento reofílico e distribuição restrita a um único ambiente, e SHIBATTA et al. (2002) também descrevem a ocorrência de *S. scriptum* na bacia do rio Tibagi, colocando esta espécie sob alto risco de extinção devido a diferentes impactos por ação antrópica, destacando a perda de nichos como o principal fator de risco.

Na bacia do rio Paraíba do Sul, a CESP (Companhia Energética de São Paulo), implementou um programa de reprodução e repovoamento de peixes. Basicamente duas espécies locais tem sido alvo deste investimento, o surubim do Paraíba (*S. parahybae*) e a piabanha (*Brycon insignis*) (HILSDORF e PETRERE Jr., 2002). Mais recentemente LUDWIG et al. (2005) apresentaram alguns procedimentos desenvolvidos na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos na Usina Ney Braga da Companhia de Energia Elétrica do Paraná

(COPEL) para a reprodução induzida do surubim *S. melanodermatum*, esse programa vem sendo desenvolvido desde 1996 tendo como principal objetivo a recuperação ambiental por repovoamento da bacia do rio Iguaçu em áreas de ocorrência natural dessa espécie. De acordo com LUDWIG et al. (2005) há intenso canibalismo entre as larvas de *S. melanodermatum*, após 48 horas de eclosão, período em que absorvem totalmente o saco vitelínico e, portanto, nessa fase é necessário transferir os animais para tanques maiores e enriquecer a alimentação com 45% de proteína animal bruta. Aparentemente esse canibalismo próprio das espécies que constituem o grupo dos grandes bagres se constitui no principal entrave para o total sucesso dos programas de cultivo em cativeiro dessas espécies. Embora o cultivo bem sucedido em viveiros com diferentes intensidades de manejo seja relatado para diferentes espécies como *Pseudoplatystoma coruscans* e *Steindachneridion melanodermatum* (CAMPOS, 2005; LUDWIG et al. 2005).

Independentemente das controvérsias que cercam os programas de repovoamento de rios por peixes cultivados e da transposição de ictiofauna, ressalta-se a importância de investigar a variabilidade genética de populações naturais e cultivadas para melhor compreender seus processos evolutivos, sua distribuição geográfica e reconhecer Unidades Evolutivamente Significativas para programas de manejo orientados para a produção e conservação genética de peixes.

1.3 – Estudos citogenéticos na família Pimelodidae

Entre os Siluriformes há cerca de 2.405 espécies (NELSON, 1994), dentre as quais a família Pimelodidae é uma das mais diversificadas contando

com 93 espécies (FERRARIS, 2007), tendo 54 já cariotipadas (SOUZA et al., 2004). Destas espécies, 23 apresentam um cariótipo considerado padrão para o grupo com $2n=56$ cromossomos (OLIVEIRA e GOSTONYI, 2000). De fato, os dados observados em diversos estudos citogenéticos têm levado a conclusão de que um padrão de evolução do tipo conservado é mais comumente aceito para a família Pimelodidae (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; BORIN e MARTINS-SANTOS, 2004). Embora alguns autores tenham sugerido a ocorrência de um padrão mais divergente que conservado para explicar as tendências evolutivas na família (DIAS e FORESTI, 1993). Essas tendências estariam diretamente relacionadas à presença de polimorfismos cromossômicos tais como cromossomos supranumerários e rearranjos por inversões pericêntricas (VASCONCELLOS e MARTINS-SANTOS, 2000), ou ainda por problemas de condensação dos cromossomos levando a falsa identificação na classificação dos mesmos com diferentes medidas cariotípicas (SWARÇA et al., 1999; SOUZA et al., 2003; CARVALHO e DIAS, 2005;).

Os polimorfismos cromossômicos e as alterações do número fundamental na família Pimelodidae têm sido extensivamente relatados na literatura, e são atribuídos aos rearranjos do tipo inversões pericêntricas e translocações Robertsonianas (GIULIANO-CAETANO, 1998; VASCONCELOS e MARTINS-SANTOS, 2000).

GARCIA e MOREIRA-FILHO (2005), analisando três espécies de *Pimelodus*: *P. fur*, *P. maculatus* e *Pimelodus* sp. da bacia do São Francisco encontraram número diplóide $2n=54$ cromossomos para a espécie *P. fur*, sugerindo eventos de fusão e translocação como possível causa para a ocorrência desse número diplóide menor que $2n=56$. Segundo esses autores o

número diplóide $2n=56$ é considerado uma plesiomorfia para o gênero *Pimelodus* e os números diplóides $2n=54$ de *P. fur* e/ou $2n=58$ como verificado para *P. blochii* (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000) poderiam representar características apomórficas.

O padrão mais comum de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos, verificado pela impregnação com nitrato de prata coloidal (Ag-RONs), entre os pimelodídeos parece corresponder à presença de uma única marcação na posição terminal do braço longo de um par de cromossomos subtlocêntricos, embora com relativo heteromorfismo de tamanho entre os homólogos como verificado por SWARÇA et al. (1999) em *Pinirampus pirinampu*, SWARÇA et al. (2001) em *Zungaro zungaro*; GARCIA e MOREIRA-FILHO (2008) em *Pimelodus fur*; TRECO et al., (2008) em *Pimelodus maculatus* e RIBEIRO et al., (2008) em *Iheringichthys labrosus*. Essa condição heteromórfica das regiões organizadoras de nucléolo é uma característica comum entre os pimelodídeos e provavelmente se deve a rearranjos de segmentos cromossômicos homólogos, duplicações gênicas, transposição ou *crossing-over* desigual.

Em relação à localização dos DNAs ribossomais 5S e 18S, destacam-se algumas abordagens recentes, usando como principal ferramenta a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Em *Pinirampus pirinampu* SWARÇA et al., (2001) encontraram regiões de 18S rDNA coincidentes com aquelas detectadas pela impregnação por prata, situando estas regiões no braço curto do maior par subtlocêntrico, e com a presença de um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos; em *Pimelodella aff. avanhandavae* SWARÇA et al., (2003) empregaram a FISH também para detectar as regiões 18S rDNA,

nessa espécie essas regiões estão localizadas no braço curto de um par submetacêntrico sem evidência de heteromorfismo. Segundo os autores, o heteromorfismo detectado somente pela técnica de coloração por prata teria uma origem funcional não estando relacionado a um maior número de cópias do gene 18S em um dos homólogos. Ainda na família Pimelodidae SOUZA et al., (2004) detectaram as regiões 18S em cinco espécies do gênero *Pimelodus*: *P. heraldoi*, *P. argenteus*, *P. maculatus*, *P. misteriosus* e *Pimelodus* sp. e encontraram um padrão conservado de localização dos cístrons ribossomais nesse gênero, que se localizou em um par subteloentríco. Entretanto, essas regiões foram variáveis quanto ao número e localização cromossômica de cópias dos genes nestas espécies. Em *P. fur*, *P. maculatus* e *Pimelodus* sp. GARCIA e MOREIRA-FILHO (2005) encontraram um heteromorfismo de tamanho envolvendo *P. fur*, confirmada tanto por Ag-RONs quanto por FISH, além disso, as regiões 5S variaram em posição e número de cópias dos genes nas espécies analisadas. De acordo com os autores o alto grau de conservação envolvendo as regiões organizadoras de nucléolo em termos de número e posição indicaria forte relação evolutiva entre as três espécies analisadas reforçada pela homologia da macroestrutura cariotípica em relação aos 20 primeiros pares cromossômicos. As diferenças observadas entre os cariótipos das três espécies devido às inversões indicariam que eventos dessa natureza teriam desempenhado um papel destacado na evolução cariotípica do gênero.

As regiões heterocromáticas na família Pimelodidae bem como nas espécies de grandes bagres estão localizadas preferencialmente nas porções teloméricas e centroméricas de alguns cromossomos (VASCONCELLOS e MARTINS – SANTOS, 2000; SWARÇA et al., 2001; SOUZA et al., 2003;

CARVALHO et al., 2004; SOUZA et al., 2004; CARVALHO e DIAS, 2005; SWARÇA et al., 2005). Entretanto, a localização intersticial da heterocromatina em algumas espécies da família Pimelodidae já foi relatada para *Pseudoplatystoma tigrinum* (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992); *Hemisorubim platyrhynchos* (MARTINS–SANTOS et al., 1996) *Iheringichthys labrosus* (VISSOTTO et al., 1999), *Pimelodus maculatus* (TRECO et al., 2008). Característica comum para a família Pimelodidae quanto à distribuição da heterocromatina é a presença de pelo menos um par de cromossomos fortemente marcados em ambos os telômeros (marcação bitelomérica) (VASCONCELLOS e MARTINS–SANTOS, 2000; SWARÇA et al. 2003; RIBEIRO et al., 2008) e que são considerados cromossomos marcadores basais que poderiam ser utilizados na compreensão das relações filogenéticas do grupo (SOUZA et al. 2004; TRECO et al., 2008).

Quanto à presença de sistemas de cromossomos sexuais, a família Pimelodidae sempre se destacou pela total ausência de descrição e diferenciação de tais cromossomos. Entretanto SWARÇA et al. (2006), ao analisarem a espécie *Steindachneridion melanodermatum* do rio Iguaçu (citado como *Steindachneridion* sp.) relataram a existência de fórmulas cariotípicas distintas para machos e fêmeas descrevendo a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais do tipo XY. O cromossomo Y, exclusivo dos machos, se apresentou heteromórfico com tamanho relativo maior do que o X e putativo uma vez que não foi verificada a presença de blocos heterocromáticos destacados como na maioria dos sistemas simples de cromossomos sexuais encontrados em peixes.

1.4 – Estudos citogenéticos no gênero *Steindachneridion*

Um estudo a respeito da citogenética dos grandes bagres foi realizado por SWARÇA (2003) em quatro espécies, destacando a presença de um incipiente mecanismo de cromossomos sexuais do tipo XY em *S. melanoderdatum* da bacia do rio Iguaçu. Segundo essa autora, este heteromorfismo sexual seria uma condição apomórfica dentre as espécies do gênero.

SWARÇA (2003) defendeu seu ponto de vista alegando que *S. melanoderdatum* seria endêmica para o rio Iguaçu e a presença de um sistema cromossômico sexual simples poderia ser consequência do isolamento geográfico desta espécie.

SWARÇA et al. (2005), realizaram a primeira inferência citogenética para a espécie *Steindachneridion scriptum* do alto rio Paraná e encontraram o número diplóide $2n = 56$ cromossomos sem nenhuma diferença cromossômica detectável entre os sexos. As regiões teloméricas foram visivelmente mais ricas em heterocromatina do que as demais regiões cromossômicas e a região organizadora de nucléolo presente no par 25 do complemento. Segundo os autores estas características também são comuns as outras espécies de pimelodídeos o que reforça a hipótese de que mesmo para espécies endêmicas como é o caso das espécies do gênero *Steindachneridion* o padrão evolucionário experimentado tem sido ao longo do tempo altamente conservativo, pelo menos em relação à macroestrutura cariotípica.

Mais recentemente SWARÇA et al. (2006) publicaram seus dados referentes à diferenciação sexual cromossômica verificada na espécie *S. melanoderdatum*. Conforme sugerem os autores, as análises meióticas

suportaram fortemente a presença de um sistema cromossômico sexual simples do tipo XY nessa espécie, e o maior tamanho do cromossomo Y em relação ao cromossomo X foi explicado como um possível evento de duplicação de DNA repetitivo, similar a seqüências *Alu*, ocorrido nos braços longo e curto desse cromossomo.

Até o presente momento nenhum outro estudo citogenético envolvendo as espécies do gênero *Steindachneridion* foi suficientemente resolutivo.

1.5 – Marcadores moleculares na conservação genética de peixes Neotropicais

TORRES et al. (2004) fizeram um levantamento sobre a aplicação de marcadores moleculares aplicados às espécies de peixes de água doce neotropicais e constataram que o primeiro artigo versando sobre a aplicação de marcadores moleculares em espécies de peixes dessa região se deve a ALVES-GOMES et al. (1995). Dos diversos trabalhos citados, os autores destacaram aqueles cujo enfoque esteve voltado para a análise da diversidade genética, isolamento geográfico e estruturação populacional.

Foi com essa finalidade que DERGAM et al. (1998) aplicaram marcadores RAPD em populações de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Iguaçu, Paraná e Tibagi e encontraram estruturação populacional bem definida dessa espécie nas bacias dos rios Tibagi e Paraná com altos níveis de variação genética dentro e entre essas populações. Para explicar esse alto índice de diversidade os autores postularam a ocorrência de populações ou espécies diferenciadas nessas bacias. Os resultados obtidos não corroboraram a hipótese inicial segundo a qual a população de *Hoplias*

malabaricus do rio Iguaçu teria se originado de um evento fundador de animais oriundos do rio Tibagi.

ALMEIDA e SODRÉ (1999) analisando seis espécies de pimelodídeos da bacia do rio Tibagi encontraram perfis RAPD espécie-específicos. Dois grupos foram identificados. Um formado pelas espécies *Pimelodus maculatus*, *P. aff. absconditus*, *Iheringichthys labrosus* e *Pinirampus pirinampu* e outro formado pelas espécies *Pimelodella aff. avanhandavae* e *P. aff. meeki*. Essa separação corroborou a classificação de PINNA (1998) na qual foram colocadas as espécies de *Pimelodella* e *Rhamdia* na subfamília antes denominada de Rhamdiinae e posteriormente de Heptapterinae e as demais na subfamília Pimelodinae, ambas pertencentes à família Pimelodidae.

DERGAM et al. (2002), usando como metodologia o sequenciamento do gene ribossomal 16S bem como marcadores RAPD, interpretaram as diferenças verificadas em *Hoplias malabaricus* da bacia do rio Doce como resultado de uma complexa história filogeográfica dessa bacia e as adjacentes. Os autores enfatizaram que a bacia dos rios Doce, Paraíba do Sul e Grande compartilharam vertentes e foram separadas pela formação da Serra da Mantiqueira durante o período Plio-Pleistoceno.

Quanto à aplicação de marcadores moleculares em populações de peixes ocorrentes nas bacias hidrográficas do Estado do Paraná, destacam-se os trabalhos de PRIOLI et al. (2002a; 2002b), MATOSO et al. (2004) e TORRES (2006). PRIOLI et al. (2002a) ao utilizarem seqüências de DNA mitocondrial e marcadores RAPD em espécies de *Astyanax* conseguiram separar populações de *A. altiparanae* e *A. bimaculatus* do rio Iguaçu e verificaram seu nível de endemismo, isolamento geográfico e similaridade

genética. Segundo os autores a espécie denominada *A. bimaculatus* deveria ser identificada como *A. altiparanae* a qual teria sido introduzida nesse sistema, com a manutenção de altos níveis de diversidade intrapopulacional e ausência de estruturação genética.

Na tentativa de gerar marcadores espécie-específicos para identificar e diferenciar *Pseudoplatystoma corruscans* de *P. fasciatum*, e visando futuras avaliações de monitoramento, PRIOLI et al. (2002b), aplicaram as técnicas de RAPD, SPAR e sequenciamento da região D-Loop do mtDNA conseguindo diferenciar ambas as espécies bem como identificar um indivíduo híbrido gerado pelo cruzamento de uma fêmea *P. fasciatum* provavelmente proveniente de escape de piscicultura. Além disso, os autores concluíram que não havia na natureza evidência de hibridação entre as espécies embora tenham apontado para um risco potencial de introgressão gênica do híbrido para a população natural de *P. corruscans*.

Em relação à bacia do rio São Francisco, WASKO e GALETTI (2002) e HATANAKA e GALETTI (2003), analisaram populações de *Brycon lundii* e *Prochilodus marginatus*, respectivamente. Os autores de ambos os trabalhos postularam a ocorrência de modelos de estruturação genética para explicar os diversos níveis de diversidade observados em ambas às espécies nos diversos sítios de coleta e inferiram a existência de um mecanismo de *homing*, comumente observado em peixes marinhos. O processo de *homing* é verificado para várias espécies animais, incluindo aves, mamíferos, répteis e peixes marinhos e consiste na migração desses animais até o seu local de nascimento para completar seu ciclo reprodutivo.

Novamente considerando o grupo dos pimelodídeos, com a intenção de gerar dados acerca da estruturação genética para fins de condução de conservação, ALMEIDA et al. (2003), estudaram populações de *Pimelodus maculatus* das bacias hidrográficas do Tietê e Paranapanema. Os marcadores RAPD forneceram um resultado de diferenciação genética entre as populações do alto Paranapanema e as demais populações do mesmo rio. Por outro lado, não foi caracterizada estruturação genética para nenhuma das populações do Tietê.

Em relação à bacia hidrográfica do rio Tibagi, MATOSO et al., (2004) analisando populações de *Astyanax fasciatus* (citado como *Astyanax* sp.), pertencentes ao Parque Estadual de Vila Velha e região de cabeceira concluíram que; embora geograficamente isoladas, as populações do parque apresentavam níveis consideravelmente altos de diversidade genética e que o tempo de isolamento geográfico não teria sido suficiente para promover acentuada diferenciação genética entre as populações, mesmo essas populações apresentando características morfo-anatômicas muito peculiares (GROSS et al., 2004).

Resultados similares quanto ao processo de *homing* para espécies de água doce foram obtidos por BATISTA e ALVES-GOMES (2006), no estudo realizado com o bagre amazônico migrador *Brachyplatystoma rousseauxii*. Esses autores após sequenciarem toda a região D-Loop de 45 indivíduos dessa espécie observaram uma acentuada diminuição da diversidade genética das populações em direção à parte oeste da Amazônia, ou seja, da região de cabeceira para a jusante da bacia. Eles explicaram seus resultados como consequência da não aleatoriedade dos indivíduos reprodutores na escolha dos

tributários amazônicos, não encontrando evidências que suportassem a estruturação genética de estoques reprodutores.

TORRES (2006) gerou dados de RFLP do gene mitocondrial citocromo b, para verificar se uma espécie identificada como *Plagioscion squamosissimus* era uma espécie invasora nos ambientes naturais da espécie congênere *P. ternetzi* e concluiu que pela análise desse marcador não havia diferença em nível molecular específico entre a amostra supostamente identificada como *P. squamosissimus* e aquela de *P. ternetzi*.

Além dos estudos mencionados, inúmeros outros existem citando as mais diversas estratégias de abordagem genética, com ampla gama de enfoques correlacionados. Apesar dos esforços empreendidos pela comunidade científica na busca de informações relevantes sobre a ictiofauna neotropical, é notório o fato de que em função da extraordinária diversidade genética e morfológica existente nas bacias hidrográficas brasileiras, muito trabalho ainda deverá ser desenvolvido. A aplicação de marcadores moleculares em espécies do gênero *Steindachneridion* a exemplo de RAPD e sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares poderão auxiliar no entendimento de sua diversidade, sua distribuição geográfica, eventos de especiação e na detecção das MOTU (Unidades Taxonômicas Operacionais definidas Molecularmente), importantes para os planos de manejo sobre conservação.

1.6 – Marcadores moleculares no gênero *Steindachneridion*

A aplicação de marcadores moleculares em espécies do gênero *Steindachneridion* é bastante recente, contando apenas com uma abordagem voltada para a análise da variabilidade genética na espécie *S. scriptum*. RAMELLA et al., (2006), usando marcadores RAPD, avaliaram o nível de variabilidade genética em 13 exemplares de *S. scriptum* capturados em diversas localidades da bacia hidrográfica do rio Uruguai. Os autores encontraram elevados índices de similaridade genética, que estariam de acordo com o índice de identidade de Nei proposto por THORPE (1982) para populações de *Salminus brasiliensis*. Nas análises de RAMELLA et al., (2006) oito espécimens apresentaram coeficiente de similaridade superior a 0,5 e seis apresentaram coeficiente de similaridade igual a 1.00, embora estas amostras tenham agrupado em dois diferentes grupos. Esses resultados parecem estar de acordo com o padrão evolutivo proposto para o gênero *Steindachneridion* e para grandes bagres que seria o de um modelo mais conservativo, pelo menos em relação à macroestrutura cariotípica das espécies. Além disso, apesar de ser um peixe migratório, em uma fase da vida, as espécies de *Steindachneridion* possuem um hábito peculiar de formarem populações que se estabelecem em regiões profundas nos canais principais dos grandes rios. O rio Uruguai é característico por apresentar grande quantidade de barragens ao longo de sua extensão, o que favoreceria as populações de *Steindachneridion* ao estruturamento genético. Apesar disso, um determinado nível de estruturação genética seria esperado mesmo em bacias hidrográficas não barradas devido ao comportamento da espécie em sua fase adulta.

1.7 – A molécula de DNA mitocondrial, os estudos evolutivos em peixes e as perspectivas de aplicação em *Steindachneridion*

Em menos de meio século os marcadores moleculares mudaram a visão científica da natureza, pois permitiram aos ecologistas e biólogos evolutivos determinar a arquitetura genética de uma ampla variedade de organismos proximamente relacionados (ALI et al., 2004). A aplicação correta da inferência filogenética está diretamente ligada ao grupo taxonômico a ser analisado e as hipóteses a serem testadas e, portanto cada técnica possui suas vantagens e desvantagens (PAGE e HOLMES, 1998).

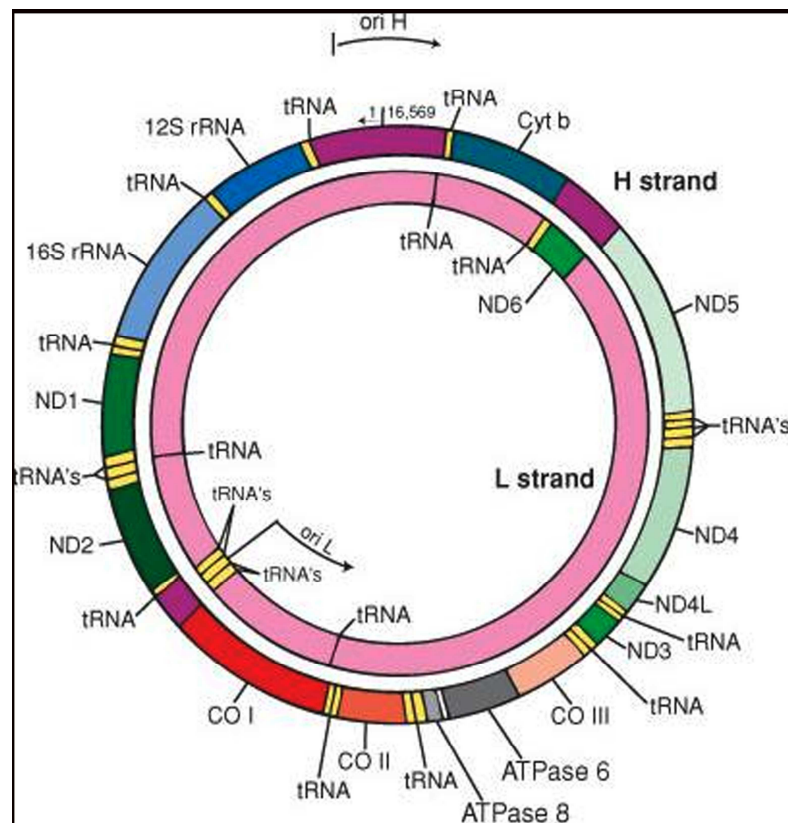
De acordo com a literatura, dados provenientes de marcadores moleculares, e mais especificamente de sequenciamento do DNA geram uma grande quantidade de informação sendo, portanto muito vantajosos para as reconstruções filogenéticas em relação a dados provenientes da taxonomia tradicional. Independentemente das controvérsias geradas pela discussão sobre a quantidade e qualidade dos dados, a análise de grandes filogenias tem sido realizada com dados de seqüências nucleotídicas tanto de regiões codificantes como não codificantes. Dentro dessa perspectiva muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o genoma mitocondrial, o qual apresenta características peculiares de grande interesse para estudos sobre as relações evolutivas dos grupos e para a inferência filogenética. Essa molécula está presente em grande quantidade nas células e está associada a um padrão de herança materno não mendeliano, possui genoma compacto em torno de 14 a 40 kb, evolui rapidamente em alguns segmentos e mais lentamente em outros. Codifica 13 proteínas muito similares em vários grupos taxonômicos, possui poucos espaços intergênicos e está organizada de forma conservada contendo

37 genes que podem estar rearranjados em diferentes organismos (BOORE, 1999).

No genoma mitocondrial uma região denominada *Displacement Loop* (D-Loop ou região controle), contém os sítios de início de replicação do mtDNA. Essa região é a mais variável desse genoma e tem sido utilizada em estudos filogenéticos em diversos níveis taxonômicos (STEPIEN e KOCHER, 1997, FABER e STEPIEN, 1997)

Para as espécies de peixes da região Neotropical são ainda poucos os estudos a utilizarem a análise de sequências nucleotídicas do mtDNA na averiguação das relações evolutivas entre os táxons, haja vista a ampla diversidade de grupos existentes nessa região (ALVES-GOMES et al., 1995, PRIOLI et al., 2002, CALCAGNOTTO et al., 2005). No grupo dos grandes bagres destaca-se o trabalho de BATISTA e ALVES-GOMES (2006) em *Brachyplatystoma rousseauxii*, desenvolvido na região da Amazônia brasileira.

Nesse contexto o trabalho aqui desenvolvido teve como objetivo explorar inferir as relações filogenéticas de oito espécies de grandes bagres usando como marcador molecular sequências D-loop do mtDNA.

Figura 1.1 – Organização do genoma mitocondrial de vertebrados.

2 - Objetivos

Usando marcadores citogenéticos e moleculares o presente trabalho visou incentivar uma discussão mais aprofundada a respeito da existência de um sistema de determinação sexual do tipo simples com heterogametia masculina na espécie *S. melanodermatum*, bem como levantar dados acerca das relações filogenéticas e filogeográficas do gênero *Steindachneridion* com seus correlatos, e inferir o nível de similaridade genética existente em matrizes mantidas em cativeiro na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Usina Ney Braga da COPEL.

Foram consideradas como metas específicas de estudo:

- a) Coletar, amostrar e constituir banco de tecido de três gêneros de grandes bagres pimelodídeos: *Steindachneridion*, *Zungaro* e *Sorubim*;
- b) Realizar ensaios de cariotipagem, RAPD e sequenciamento da região controle (D-Loop) do mtDNA na espécie *S. melanodermatum*;
- c) Executar o sequenciamento da região controle (D-Loop) do mtDNA nas espécies *Steindachneridion scriptum*, *Steindachneridion doceanum*, *Steindachneridion parahybae*, *Steindachneridion melanodermatum*, *Zungaro zungaro* e *Sorubim lima*;
- d) Analisar a diversidade e a distância genética nessas espécies;
- e) Inferir sobre as tendências evolutivas do gênero *Steindachneridion*;
- f) Estabelecer relações filogenéticas e filogeográficas entre as espécies do gênero *Steindachneridion* em relação aos grupos externos *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma vaillantii*, *Zungaro zungaro* e *Sorubim lima*.

3 – Material e Métodos

3.1 – Objeto de estudo e locais de coleta

Nesse estudo foram amostrados 88 espécimes de grandes bagres, pertencentes a seis diferentes espécies de Pimelodidae. Cinquenta e cinco exemplares foram amostrados para a espécie *S. melanodermatum* do rio Iguaçu (PR), 13 exemplares da espécie *S. scriptum* do rio Uruguai (SC), seis da espécie *Steindachneridion scriptum* do rio Tibagi (PR), 10 da espécie *S. parahybae* do rio Paraíba do Sul (SP) e dois da espécie *S. doceanum* do rio Doce (MG) (Figura 1.3). Um exemplar da espécie *Sorubim lima* e outro da espécie *Zungaro zungaro* ambos do rio Paraguai (MT), foram amostrados e relacionados como grupo externo nas análises filogeográficas. Os exemplares de *Steindachneridion* foram provenientes de quatro bacias hidrográficas brasileiras: bacia do rio Tibagi, bacia do rio Iguaçu, bacia do rio Uruguai e bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 1.2). Os exemplares foram identificados segundo os critérios propostos por Garavello (2005) e depositados no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Figura 1.2 – Distribuição pelo território brasileiro de todas as espécies descritas de *Steindachneridion*, segundo J. C. Garavello (2005).

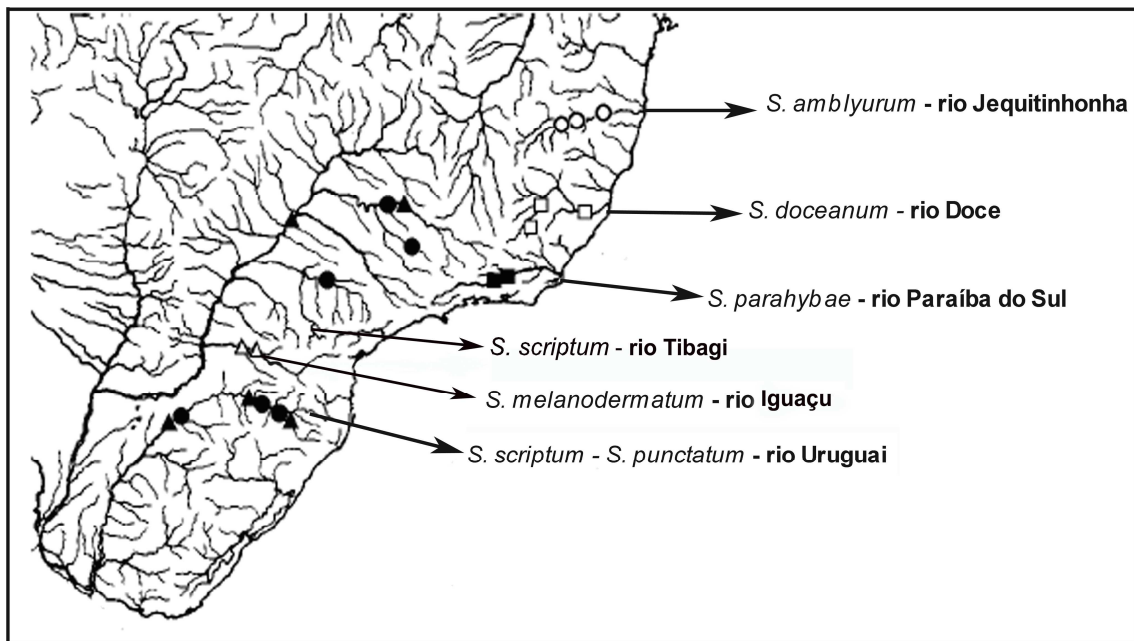
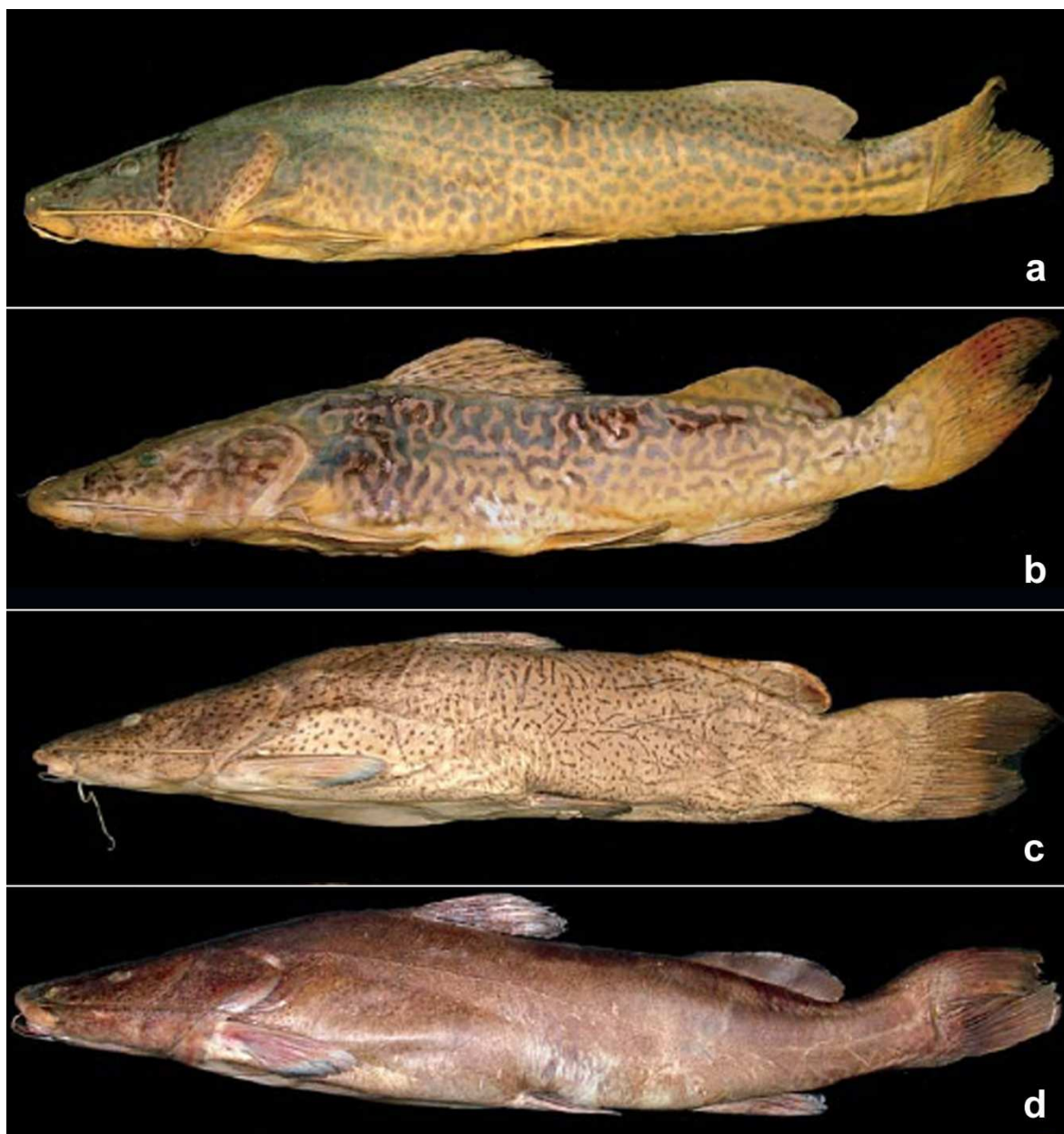


Figura 1.3 – Exemplos do gênero *Steindachneridion*. a) *S. parahybae*, b) *S. doceanum*, c) *S. scriptum*, d) *S. melanodermatum*. (créditos J. C. Garavello, 2005).



3.2 – Metodologias

3.2.1 – Obtenção de metáfases mitóticas

Para obtenção de um maior número de metáfases mitóticas foi utilizada a técnica de LEE e ELDER (1980), que consiste em injetar previamente nos animais uma solução de fermento biológico na musculatura próxima à nadadeira dorsal.

3.2.2 – Obtenção de metáfases mitóticas – método direto (Bertollo et al., 1978)

Injetar intraperitonealmente no peixe, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução de colchicina (0,025%), na proporção de 1ml por 100g de massa corpórea do animal;

Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 40 minutos sacrificando-o posteriormente para a retirada de seu órgão hematocitopoiético: rim anterior ou posterior;

Colocar o tecido em 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C;

Fragmentar esse material, com auxílio de pinça de dissecação desprovida de agulha, aspergindo e expirando o material até que fique homogêneo;

Transferir o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por 20 minutos (pedaços de tecidos ainda não desfeitos são descartados);

Acrescentar 1ml de fixador Carnoy recém preparado (álcool metílico : ácido acético 3:1), e ressuspender o material deixando-o em temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugá-lo durante 10 minutos a $1,19 \times 10^{12}g$;

Descartar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur;

Adicionar 6-8 ml de fixador;

Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a $1,19 \times 10^{12}g$;

Descartar o sobrenadante e repetir esse procedimento;

Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1 ml de fixador para 0,5 ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo;

Colocar uma lâmina limpa em água a 60° C. Pingar três gotas da suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida e secar ao ar;

O material deve ser guardado em tubos tipo eppendorf e mantidos em freezer à -20°C.

3.2.3 – Obtenção de metáfases mitóticas – método indireto *in vitro* (Fenocchio et al., 1991)

Retirar aproximadamente 3mm³ da porção anterior do rim e colocar em uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal e antibiótico;

Desagregar o material com pinça de ponta fina com posterior aspensão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha;

Incubar a solução de células em estufa a 29° C por 7 horas em média;

Pingar três gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente 25 minutos antes de completar o tempo. Agitar suavemente a placa de Petri para homogeneizar o material e manter em estufa até o término do tempo;

Transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar por 10 minutos a $9,64 \times 10^{11}g$;

Descartar o sobrenadante e completar o tubo de ensaio até 8 ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). Ressuspender a solução e incubar por cerca de 30 minutos a uma temperatura de $37^{\circ}C$;

Preparar solução fixadora com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração. Após o tempo da hipotonização, pingar algumas gotas do fixador em cada tubo;

Ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar por 10 minutos a $9,64 \times 10^{11}g$;

Descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo até o volume de 8 ml;

Novamente ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos a $9,64 \times 10^{11}g$;

Repetir a etapa anterior por duas vezes;

Descartado o sobrenadante, colocar 1,5 ml do fixador e ressuspender o material. Armazenar a solução em tubo tipo eppendorf mantendo-o em freezer à $-20^{\circ}C$.

3.2.4 - Método de coloração convencional Giemsa

Para analisar o número e morfologia dos cromossomos, as lâminas preparadas com a suspensão celular foram coradas com solução do corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 ($KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) a 5% durante

aproximadamente 10 minutos e em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.2.5 – Identificação cromossômica

A identificação cromossômica foi realizada baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposta por LEVAN et al., (1964) e classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtlocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00). As metáfases foram capturadas por câmara CCD Olympus DP71 com resolução de 13mp acoplada a um Microscópio Olympus BX 40 com o programa ImageProPlus 5.0.

3.2.6 – Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs (Howell e Black, 1980)

Em lâminas previamente preparadas para a obtenção de cromossomos mitóticos pingar uma gota da solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas da solução de nitrato de prata (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina;

Cobrir a lâmina com lamínula;

Levar a lâmina à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada;

Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar;

Se necessário, corar com Giemsa diluída a 1% em tampão fosfato pH 6,8 por 30 segundos.

3.2.7 – Detecção da heterocromatina - (Sumner, 1972)

Colocar a lâmina recentemente preparada para a obtenção de cromossomos mitóticos em solução de HCl 0,2N, a 42°C, por 5 minutos;

Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar;

Colocar a lâmina em solução de hidróxido de bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 28°C por aproximadamente 20 segundos;

Imergir a lâmina rapidamente em ácido HCl 0,2N e lavar com jatos de água;

Colocar a lâmina em uma solução de 2xSSC (15,53 g de NaCl + 8,82 g de Citrato Trissódico + Água deionizada) por uma hora à 60° C;

Lavar a lâmina em água destilada e secar ao ar;

Corar o material com iodeto de propídeo e examinar as lâminas com filtro para o comprimento de onda de 430 a 480 nm.

3.2.8 – Obtenção de padrão similar ao bandamento G pelo corante Wright

Manter as lâminas recentemente preparadas para a obtenção de cromossomos mitóticos em estufa à 37°C por três a sete dias;

Mergulhá-las em solução salina 2xSSC à 60°C por dois minutos e 30 segundos;

Lavar as lâminas em água destilada e corar com Wright (2,5 g diluídas em um litro de metanol);

Diluir o corante Wright em tampão fosfato pH 6.8 na proporção de 3:1 (Tampão Wright).

Corar as lâminas na solução diluída por dois minutos e 30 segundos.

3.2.9 – Coloração pelo fluorocromo DAPI (Schweizer, 1980)

Mergulhar a lâmina em solução DAPI 0,3 µg/ml, recém preparada, por 30 minutos no escuro;

Lavar em água destilada e secar ao ar;

Colocar sobre a lâmina algumas gotas da solução de montagem e cobrir com lamínula. Retire o excesso com papel filtro;

Estocar a lâmina no escuro por 72 horas a temperatura ambiente.

Analisar as lâminas em microscópio de epifluorescência, usando um comprimento de onda de 360 a 390 nm.

3.2.10 – Isolamento de sequências repetitivas obtidas pela cinética de reassociação do DNA (*Cot-1*) (Zwick et al., 1997).

Diluir o DNA genômico a 100-500 ng/ul em 0,3M NaCl;

Colocar 500 ul de DNA em tubos de 1,5 ml;

Autoclavar por 3 a 5 minutos a 1.0 atm/120°C;

Aplicar 3 ul do DNA autoclavado em gel de agarose 1% para checar o tamanho dos fragmentos obtidos (ideal obter fragmentos entre 100 e 1.000 pb);

Desnaturar 3 alíquotas (tubos 0, 1 e 5) com 50 µl do DNA autoclavado em banho a 95°C por 10 minutos;

Passar os tubos para gelo por 10 segundos: tratar imediatamente o tubo 0 com S1 nuclease e colocar os tubos 1 e 5 em banho a 65°C para renaturação.

Após 1 minuto, retirar o tubo 1 e tratar com S1 nuclease e após 5 minutos, retirar o tubo 5 e tratar com S1 nuclease;

Para o tratamento com S1 nuclease, utilizar 1U da enzima para 1ug de DNA e 5,5 µl tampão 10X para o volume final de 50 µl.

Incubar a 37°C por 8 minutos;

Congelar imediatamente em nitrogênio líquido;

Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio (1:1);

Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm. Coletar a fase aquosa e passar para um tubo novo;

Precipitar o DNA com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;

Deixar no freezer a -75°C por 30 minutos;

Centrifugar por 15 minutos a $18,75 \times 10^{11}g$ a 4°C. Secar e ressuspender em 50 ul de água milliQ autoclavada.

Checar o DNA em gel de agarose 1%.

3.2.11 – Isolamento de sequências repetitivas obtidas por microdissecção cromossômica (Hu et al., 1998) e DOP-PCR (Telenius et al., 1992).

I – Preparação das agulhas

As agulhas usadas para microdissectar os cromossomos foram produzidas a partir de capilares de vidro com diâmetro de 0,5 mm por aquecimento em *puller* (Narishige modelo PC 10).

II – Microdissecção cromossômica e DOP- PCR

Pingar no centro de uma lamínula uma gota da preparação cromossômica (suspensão celular) minutos antes da microdissecção;

Com as microagulhas de vidro fixadas no micromanipulador eletrônico (Joystick, TranferMan NK2, Eppendorf) acoplado a um microscópio invertido Olympus IX 71, “raspar” o cromossomo de interesse.

Colocar o material microdissectado, quebrando a ponta da agulha, em microtubos de 0,2 ml contendo uma combinação do oligonucleotídeo 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3' (TELENIUS et al., 1992), tampão de reação da termosequênase, dNTP e enzima termosequênase.

Realizar uma PCR convencional;

Aplicar o produto em gel de agarose 1% e corar com brometo de etídio 1% (10 mg/ml);

Visualizar em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.12 – Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de rDNA 18S E 5S (White et al., 1990)

Para a identificação das regiões de rDNA foram utilizadas duas sondas, uma para rDNA 18S obtida via PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004), usando os *primers* NS1 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC – 3' e NS8 5' TCCGCAGGTTACCTACGG – 3' (White et al., 1990) e outra sonda de rDNA 5S obtida de *Leporinus obtusidens* (MARTINS e GALETTI, 1999), usando os *primers* A (5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e B (5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3').

I - Marcação da sonda por *nick translation*

Para marcação da sonda, foi utilizado o kit *Nick Translation* da Invitrogen.

Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml a 0°C: 28,3 µl de água em quantidade suficiente para a sonda rDNA 18S e 23,6 µl de água em quantidade suficiente para a sonda rDNA 5S; 7,5 µl de dNTP Mix 10x com dATP mais biotina; 2,7 µl de DNA 18S e 6,4 µl de DNA 5S; 7,5 µl de enzima mix 10x

(DNAse + DNA polimerase I). O volume final da reação deve ser 45 µl para cada sonda e o volume de água a ser colocado depende da concentração da sonda;

Misturar e centrifugar brevemente (aproximadamente 5 segundos), incubando à 16°C durante 2 horas;

Colocar o tubo no gelo após duas horas e checar o tamanho dos fragmentos em gel de agarose (estes devem medir entre 100 e 500 pb);

Adicionar 7,5 µl de tampão de parada;

Precipitar o DNA com 5 µl de acetato de sódio 3M e 100 µl de etanol P.A.;

Incubar à - 20° C por 12h;

Centrifugar a $1,63 \times 10^{14}g$ por 10 minutos;

Centrifugar a $1,63 \times 10^{14}g$ por 5 minutos;

Descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em 2 µl de água;

II – Tamanho dos fragmentos em gel

Misturar 1 µl da reação de *nick translation* com 1 µl de azul de bromofenol e aplicar em gel de agarose 0,8% e 1 µl brometo de etídio;

Aplicar a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos;

III – Hibridação fluorescente in situ (FSH)

Lavar as lâminas em tampão PBS uma vez durante 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada (secar);

Incubar as lâminas em 90 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;

Fixar em formaldeído 1% em PBS uma vez, 50 mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente;

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85%, 100% por 5 minutos cada;

Desnaturar em série alcoólica, a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;

Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada;

Preparar câmara úmida à 37°C;

Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar 12h à 37°C;

IV - Lavagens

Lavar duas vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada sob agitação;

Lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada sob agitação;

Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/ 4xSSC por 15 minutos;

Lavar duas vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/ 800 µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/800 µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar ao ar;

V – Montagem da lâmina

Misturar 200 µl de *antifading* mais 8 µl de iodeto de propídeo (50 µg/ml);
Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

3.2.13 – Obtenção de células meióticas para análise da meiose convencional (Kligerman e Bloom, 1977)

Retirar as gônadas cortando-as em pequenos pedaços;
Colocar o tecido em uma cubeta com água destilada ou solução hipotônica de KCl 0.075M;
Deixar o tecido hipotonizando por aproximadamente uma hora e 20 minutos;
Após esse período colocar o material em fixador Carnoy (metanol: ácido acético 3:1) por 30 minutos;
Repetir a fixação trocando o fixador e manter o material por mais 30 minutos;
Após a segunda fixação trocar o fixador colocando-o em um tubo tipo eppendorf de 2 ml e estocar a -20°C.

3.2.14 – Preparação das lâminas para análise meiótica convencional

Colocar a gônada em uma cubeta apropriada para macerar o tecido;
Cortar o tecido em pequenos pedaços;
Pingar duas a três gotas de uma solução de ácido acético 60% e com ajuda de um bastão macerar o material até obter uma solução homogênea;
Pingar duas a três gotas da solução em uma lâmina limpa aquecida a aproximadamente 40°C;
Esperar o ácido acético evaporar tomando o cuidado de homogeneizar a solução sobre a lâmina sem deixá-la aquecer muito para não estragar a preparação;

Corar a lâmina em solução de Giemsa 5% com tampão fosfato.

3.2.15 - Análise dos Marcadores citogenéticos

Para cada uma das técnicas aplicadas foram examinadas 30 células metafásicas ou meióticas. As preparações foram visualizadas em microscópio óptico de campo claro e epifluorescência Olympus BX 40 e capturadas com câmera digital CCD Olympus DP71 13 mp. Para a análise com DAPI foi utilizado filtro de comprimento de onda variando de 360 a 390 nm. As bandas C foram coradas com iodeto de propídeo e analisadas com filtro para o comprimento de onda de 430 a 480 nm.

3.2.16 – Extração de DNA – (Sambrook e Russel, 2001).

Colocar o tecido (1/1 cm³) em um almofariz e macerá-lo com nitrogênio líquido com auxílio de um bastão de louça;

Adicionar 250 µl de solução de lise (NaCl 0.4M, EDTA 0.1M pH 8.0, Proteinase K 100 µg/ml, SDS 0.1%) e homogeneizar a amostra;

Transferir o material para um tubo tipo eppendorf e mantê-lo em banho-maria à temperatura de 50°C durante uma hora e 30 minutos;

Adicionar 250 µl de RNase (100 mg/ml) mantendo-o em banho-maria à 37°C por 1 hora, procedendo a leve agitação periódica;

Acrescentar 500 µl de uma solução contendo fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 50: 48: 2;

Agitar suavemente o tubo por 30 minutos;

Centrifugar o material por 10 minutos a $8,33 \times 10^{13}g$;

Transferir com auxílio de pipeta o sobrenadante, sem a camada fenólica;

Adicionar NaCl 1M para a precipitação do DNA juntamente com 2 volumes de etanol gelado absoluto;

Inverter o tubo diversas vezes para a visualização do DNA;

Centrifugar o material por 5 minutos a $8,33 \times 10^{13}g$ e descartar o sobrenadante;

Adicionar 500 μ l de etanol 70% e deixar descansar por 5 minutos;

Centrifugar o material por 5 minutos a $8,33 \times 10^{13}g$ e descartar o sobrenadante;

Secar o DNA em estufa à 37°C por 12h;

Ressuspender o DNA em 30 μ l de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) ou água autoclavada e armazenar em freezer a - 20°C.

3.2.17 – Extração de DNA – Método CTAB (Murray e Thompson, 1980)

Preparar o Tampão CTAB para um volume final de 15 ml seguindo a formulação:

6 ml CTAB 5% (concentração final 2%)

3 ml de NaCl 5M (concentração final 1M)

3 ml EDTA 0,5M (concentração final 0,1M)

3 ml TRIS-HCl 1M pH 8.0 (concentração final 0,1M)

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

I - Processo de extração:

Colocar em um tubo 0,2g de tecido muscular, 600 μ l de tampão CTAB, 13 μ l de proteinase K (10 mg/ml) e 15 μ l de DTT (1M);

Colocar a 60°C por 10 horas ou até que o tecido esteja totalmente digerido;

Adicionar ao tubo 10 μ l de RNase (10 mg/ml) e manter à 37°C por 3 horas;

Adicionar 600 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1);

Agitar durante 5 minutos (vórtex suave). Centrifugar a $5,33 \times 10^{14}g$ por 5 minutos;

Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;

Adicionar 450 μl de Isopropanol e deixar a $-20^{\circ}C$ por 2 horas ou 12h;

Centrifugar a $1,63 \times 10^{14}g$ por 15 minutos (alinhar os tubos na centrífuga).

Descarta-se o sobrenadante;

Lavar o pellet com 450 μl de etanol 70%. Centrifugar por 2 minutos e retirar o sobrenadante.

Deixar secando na estufa a $37^{\circ}C$ e ressuspender em 150 μl de água mili-Q.

3.2.18 – Preparação do gel de agarose 0,8% e 3% para eletroforese e visualização do DNA

Pesar 0,8 ou 3 gramas de agarose e colocar num Erlenmeyer de 250 ml;
Diluir a agarose em 100 ml de tampão TBE uma vez, aquecendo a solução em forno microondas e cuidando para que não permaneçam blocos não dissolvidos no frasco;

Esperar a solução esfriar a temperatura ambiente e em seguida colocá-la na cuba de eletroforese na presença de um pente para formar poços para aplicação das amostras;

Aguardar a polimerização do gel;

Retirar cuidadosamente o pente para não estragar os poços e adicionar o tampão TBE uma vez na cuba até cobrir os eletrodos;

Injetar o DNA nos poços junto com o tampão de aplicação (azul de bromo fenol);

Inserir os eletrodos nas posições indicadas da cuba, ligar a fonte na corrente elétrica programando-a para 100 Volts;

Deixar o DNA migrar no gel por 5 horas;

Retirar o gel da cuba e corá-lo com brometo de etídeo (10mg/ml) diluído em TBE uma vez por 15 minutos;

Retirar o gel do tampão TBE, colocando-o sobre o transiluminador;

Ligar a luz ultravioleta, visualizar as bandas de RAPD rapidamente para evitar degradação e fotografar o gel.

3.2.19 – Análise molecular baseada em marcadores RAPD (Williams et al., 1990)

A técnica de RAPD está baseada na amplificação do DNA genômico via PCR (Polymerase Chain Reaction), usando primers de seqüências nucleotídicas arbitrárias. Para obter os marcadores RAPD foi realizado um teste prévio com um conjunto de 12 oligonucleotídeos e seleção daqueles que demonstraram maior consistência na amplificação possibilitando o estabelecimento de um padrão. Foram incluídos controles negativos contendo todos os componentes da reação à exceção do DNA molde. As reações foram realizadas de acordo com as especificações de cada fabricante. Os oligonucleotídeos usados na amplificação foram provenientes dos kits OPW, OPAM e OPAK da Operon Technologies, e as condições de PCR foram as seguintes: 40 ciclos de 40 segundos a 92°C, um minuto e 30 segundos a 40°C e dois minutos a 72°C. Para os oligonucleotídeos do kit Ready-to-go da Amersham-Pharmacia as condições de PCR foram as seguintes: 35 ciclos de um minuto a 92°, um minuto e 30 segundos a 37°C e três minutos a 72°C.

Todas as reações foram realizadas em termociclador modelo PTC-100 MJ Research.

As reações foram realizadas em volume de 25 µl, contendo 50 ng de DNA, Ampli Taq DNA polimerase (1.5 U), 200 mM de cada dNTP, 2.5 µg de BSA, 25 pmol de primers e tampão de reação (MgCl₂ 3 mM, KCl 30 mM, Tris 10mM pH 8.3). Um volume de 10 µl do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 3% e visualizado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta depois de corrida de 5 horas a 100 Volts. As imagens foram fotodocumentadas pelo sistema Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

3.2.20 – Sequenciamento da região D-loop

O sequenciamento da região controle das 6 espécies de pimeleodídeos foi realizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, para 41 indivíduos amostrados. A região D-Loop inteira foi sequenciada utilizando a reação de PCR com um volume total de 30 µl e 5 ng de DNA total, 1.5 mM MgCl₂, tampão de reação uma vez, 200 µM de dNTPS, 0.5µM de cada primer e 0.5 unidades de Taq DNA polimerase. Os primers usados foram o FTTP: 5'CAA AGC GCC GGT CTT 3' e F12R 5'GTC AGG ACC ATG CCT TTG3'(SIVASUNDAR et al., 2001). A amplificação foi realizada em 30 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: para os primeiros cinco ciclos foram utilizadas as temperaturas de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 1.5 minutos a 72°C. Para os 25 ciclos restantes a temperatura de hibridação foi abaixada para 50°C. Os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida em gel de agarose 0,8% usando o fago λ como marcador de massa molecular. Os produtos foram

subsequentemente purificados com o kit Wizard (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. O produto purificado foi sequenciado com o kit DyEnamic ETdye Terminator MegaBace (GeHealthcare) em 35 ciclos seguindo as seguintes temperaturas: 20" a 95°C, 15" a 50°C, 1'20" a 60°C. O produto do PCR foi então injetado em sequenciador MegaBace utilizando diferentes condições de corrida: corrida 1 – tempo de corrida 220 minutos, voltagem de 6 Kv, tempo de injeção 150 segundos, voltagem da injeção 1.5 Kv, corrida 2 – tempo de corrida 300 minutos, voltagem de 6 Kv, tempo de injeção 100 segundos, voltagem da injeção 3 Kv.

3.3 – Análise estatística dos dados

3.3.1 – Marcadores RAPD

Os dados de RAPD foram inseridos numa matriz binária codificados como 1 ou 0 conforme a presença ou ausência de fragmentos observados no gel, assumindo-se que alelos de diferentes *loci* migram para posições diferentes no gel e que cada banda representa um loco Mendeliano de caráter dominante que se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo nulo recessivo não é visível (LYNCH e MILLIGAN, 1994). O programa NTSYS-PC versão 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 2000) foi utilizado para estimar o nível de similaridade genética intrapopulacional através do coeficiente de JACCARD (1901), que leva em consideração o número de concordâncias positivas entre dois indivíduos e o número de características únicas presentes num indivíduo e no outro, contemplando por isso a dupla presença.

$$J=a/(a+b+c)$$

Onde:

a corresponde ao número de concordâncias positivas entre dois indivíduos x e y ;

b corresponde ao número total de características únicas presentes no indivíduo x ;

c corresponde ao total de características únicas no indivíduo y .

Análises de agrupamento foram realizadas pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average) (SNEATH; SOKAL, 1973). Os valores de bootstrap foram obtidos com o programa BOOD versão 3.03 (COELHO, 2004). Os valores de heterozigosidade, porcentagem de *loci* polimórficos, distância e identidade de NEI (1972,1978), análise de estruturação e teste exato de diferenciação populacional, foram obtidos através do programa TFGA versão 1.3 (MILLER, 1997).

3.3.2 – Sequências D-loop do mtDNA

As sequências foram alinhadas pelo programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Os parâmetros para os alinhamentos par-a-par foram de 6.6 e 10.0 e para os alinhamentos múltiplos foram de 10.0 e 15.0, para abertura e extensão de gaps, respectivamente. As comparações par a par e multi-alinhamentos foram realizados usando o programa Paup* versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) e MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). As análises filogenéticas foram também realizadas no MrBayes versão 3.1.1 (HUELSENBECK et al., 2001; RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Foram efetuadas análises usando diversas medidas de distâncias genéticas e métodos de agrupamento. O programa Modeltest 3.0 (POSADA e CRANDALL,

1998), foi utilizado para determinar o modelo ótimo de evolução nucleotídica, usando o critério de AKAIKE (AIC).

Capítulo II

Polimorfismos cromossômicos na espécie *Steindachneridion melanodermatum* Garavello 2005 (Siluriformes, Pimelodidae)

Abstract

Fifty five specimens of *Steindachneridion melanodermatum* were investigated using molecular and classical cytogenetics tools. Two polymorphisms were found, one involving the length of nucleolus organizers regions and another involving two submetacentric chromosomes previously identified like sexual chromosomes. The results suggested the occurrence of polymorphism due to homogeneity between karyotypes of males and females and its presence in both the sexes.

Key words: evolutionary biology, karyotype evolution.

Resumo

Cinquenta e cinco espécimes de *Steindachneridion melanodermatum* foram investigados utilizando ensaios de citogenética clássica e molecular. Dois polimorfismos foram encontrados, um envolvendo o tamanho das regiões organizadoras de nucléolos, e outro envolvendo dois cromossomos submetacêntricos previamente diagnosticados como cromossomos sexuais. Os resultados da presente pesquisa sugerem a ocorrência de polimorfismo devido à homogeneidade dos cariótipos entre machos e fêmeas e a presença desses cromossomos em ambos os sexos.

Palavras-chave: biologia evolutiva, evolução cariotípica.

Introdução

Steindachneridion melanodermatum GARAVELLO (2005), é uma espécie de grande bagre endêmica ao rio Iguaçu popularmente conhecida por surubim ou monjolo. Essa espécie tem sido alvo de estudos relacionados à sua dinâmica reprodutiva e comportamental, assim como estudos citogenéticos. Neste contexto, SWARÇA et al., (2006) foram pioneiros na caracterização cariotípica e descreveram um sistema de cromossomos sexuais XX/XY nessa espécie. Segundo esses autores o cromossomo Y típico dos machos e de maior tamanho que o X teria sofrido uma duplicação de sequências repetitivas, similares a sequências *Alu*, nos braços longo e curto desse cromossomo, e sequências de DNA repetitivo teriam tido importante papel na diferenciação morfológica desse sistema cromossômico sexual. Na família Pimelodidae e mais especificamente entre os grandes bagres a descrição de um sistema sexual simples nunca havia sido anteriormente observada.

A diferenciação de cromossomos sexuais em peixes é bastante divergente entre os táxons e não representa uma condição basal como verificado em outros vertebrados a exemplo de mamíferos (XX/XY) e aves (ZZ/ZW) (ARTONI et al., 2001). Embora somente cerca de 5% dos peixes neotropicais apresentem cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados (CENTOFANTE et al., 2002), a heterogametia masculina e feminina em sistemas simples envolvendo somente um par de cromossomos ou em sistemas múltiplos com vários cromossomos envolvidos pode ser verificada. Nesse sentido foram descritos diversos sistemas de cromossomos sexuais em peixes (BERTOLLO et al., 1997; BERTOLLO e MESTRINER, 1998;

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanodermatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

MAISTRO et al., 1998; BORN e BERTOLLO, 2000; WASKO et al., 2001, VENERE et al., 2004; VICARI et al., 2006, SILVA e MARGARIDO, 2007), envolvendo tanto a heterogametia masculina quanto a feminina em ambos os tipos de sistemas, simples e múltiplos.

Na intenção de gerar dados que corroborassem ou não a existência de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em *S. melanodermatum*, foram aplicadas técnicas de citogenética clássica e molecular para aprofundar sua análise nessa espécie de grande bagre endêmica do rio Iguaçu.

Material e Métodos

Foram analisados os cariótipos de 55 espécimes de *S. melanodermatum* provenientes da bacia hidrográfica do rio Iguaçu, sendo 12 machos, quatro fêmeas e dois de sexo não identificado coletados na natureza (n=18) e 27 machos, quatro fêmeas e seis de sexo não identificado nascidos em cativeiro (n=37) na Estação de Estudos Ictiológicos da Usina Nei Braga (COPEL) (Figura 2.1). Os exemplares foram identificados segundo GARAVELLO (2005) e tombados no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A identificação do sexo foi realizada pela biópsia parcial das gônadas, examinadas a fresco em microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x (Figura 2.1). Seguida a identificação, as gônadas foram retiradas e armazenadas em fixador Carnoy 3:1.

As preparações mitóticas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO et

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanodermatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

al., 1978), enquanto as preparações das células meióticas de espermatócitos e ovócitos foram obtidas de acordo com o método de KLIGERMAN e BLOOM (1977). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram visualizadas com nitrato de prata (HOWELL and BLACK, 1980), e a heterocromatina foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972). Um bandamento similar àquele obtido para bandas G positivas foi realizado pela coloração com corante de Wright.

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de rDNA, utilizando-se a sonda de rDNA 18S obtida de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004) e a sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999). As sondas 18S e 5S foram marcadas com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal foram realizadas com os seguintes componentes: “TSA Kit with HRP.streptavidin and Alexa Fluor 488 tyramide” (Molecular Probes) para a sonda 18S; e sistema avidina-FITC conjugado – anti-avidina biotina conjugada (Sigma) para a sonda 5S. O procedimento geral de hibridização seguiu o protocolo descrito por PINKEL et al. (1986). A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX40. As imagens cromossômicas foram capturadas com a utilização de câmara CCD Olympus DP71 e Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da

sua razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em tamanho decrescente nos cariótipos.

Resultados

Um número diplóide de $2n=56$ cromossomos foi observado para ambos os sexos. A fórmula cariotípica foi composta por $14m + 22sm + 12st + 8a$, com número fundamental (NF) igual a 104 em ambos os sexos. Em alguns exemplares examinados o segundo cromossomo submetacêntrico de número 9 e outro submetacêntrico de número 14 de menor tamanho não apresentaram homólogos (Figura 2.2). Nas análises das células meióticas foi observada a presença de 28 bivalentes com a ocorrência de um a dois quiasmas por cromossomo na fase de diplóteno e diacinese (Figura 2.3). Nas células em paquíteno os cromossomos apareceram pareados ponta a ponta. Para ambos os sexos não foram observados pareamentos irregulares ou atípicos em qualquer uma das imagens meióticas analisadas.

A heterocromatina foi localizada na região pericentromérica dos pares cromossômicos 1, 3 e 19 e também nas regiões teloméricas dos pares acrocêntricos 25, 26, 27 e 28, como marcações muito pequenas. Apareceram também porções heterocromáticas intercaladas e associadas às regiões organizadoras de nucléolo (Figura 2.4).

A região organizadora de nucléolo, identificada pela coloração por nitrato de prata coloidal, foi localizada na porção telomérica do braço curto do primeiro par de cromossomos acrocêntricos de número 25 nos exemplares sem polimorfismo e número 26 nos exemplares com polimorfismo, algumas vezes

apresentando heteromorfismo de tamanho entre os cromossomos homólogos. As regiões de rDNA 18S obtidas pela FISH foram coincidentes com as Ag-RONs evidenciando o mesmo heteromorfismo funcional visto com as marcações por prata. O rDNA 5S foi identificado no primeiro par subtelocêntrico de número 19 nos exemplares sem o polimorfismo e no par número 20 nos exemplares com polimorfismo (Figuras 2.5 e 2.6). Um padrão de bandamento longitudinal semelhante a um padrão de bandamento G, permitiu um melhor pareamento dos cromossomos homólogos, e em especial possibilitou a diferenciação do par organizador nucleolar (Figura 2.7).

Discussão

Na família Pimelodidae um cariótipo composto por 56 cromossomos e elevado número fundamental é uma característica comum, particularmente no que se refere ao grupo Sorubiminae (FENOCHIO e BERTOLLO, 1992; SWARÇA et al., 2005, 2006). Diversos autores têm proposto que 56 cromossomos seria o número diplóide ancestral dentro de Siluriformes (OLIVEIRA e GOSZTONY, 2000; GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2005), portanto esta seria uma condição basal do grupo e alterações desse número poderiam ser consideradas um caráter derivado.

De acordo com a literatura os pimelodídeos apresentam ampla variação cariotípica relacionada à presença de cromossomos supranumerários ou a rearranjos de segmentos cromossômicos homólogos, duplicações gênicas, transposição e crossing-over desigual, os quais envolvem mais frequentemente as regiões organizadoras de nucléolo (SWARÇA et al., 1999, SWARÇA et al.,

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanoderdatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

2001; GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2008; TRECO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Em *S. melanodermatum* foram detectados dois diferentes polimorfismos como variação intrapopulacional. Um polimorfismo está relacionado ao tamanho de dois cromossomos submetacêntricos, onde um deles (cromossomo 9) é muito maior que o outro submetacêntrico (cromossomo 14). Segundo SWARÇA et al. (2006), esse cromossomo maior seria um cromossomo Y putativo, não heterocromático de origem recente, e teria sofrido uma duplicação nos braços longo e curto de sequências repetitivas similares a sequências *Alu*. Os resultados da presente pesquisa mostram que o cromossomo submetacêntrico maior está presente também nas células de fêmeas não podendo ser considerado um cromossomo Y como proposto.

Nesse sentido para testar a hipótese de existência ou não do sistema cromossômico sexual XX/XY em *S. melanodermatum* foram aplicadas técnicas de meiose convencional. As análises de imagens meióticas têm possibilitado a visualização do comportamento cromossômico durante a segregação na meiose, e por isso as técnicas de meiose convencional e do complexo sinaptonêmico tem sido associadas à análise de células mitóticas para a investigação de sistemas sexuais simples e múltiplos em diversas espécies de peixes (BERTOLLO et al., 1978, 1979; BRUM et al., 1992; FORESTI e OLIVEIRA, 1993; MESTRINER et al., 1995; BERTOLLO e MESTRINER, 1998).

Os resultados dos ensaios conduzidos com meiose convencional em *S. melanodermatum* não corroboraram a existência de um sistema cromossômico sexual nessa espécie, embora a não visualização de pareamento heterólogo

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanodermatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

durante o processo meiótico não seja suficiente para descartar a ocorrência de um sistema sexual quando presente. BERTOLLO et al., (1978), descreveram um sistema de cromossomos sexuais simples com heterogametia masculina (XX/XY) em *Hoplias malabaricus*, onde não conseguiram visualizar um pareamento heterólogo na meiose. Por outro lado, a análise do complexo sinaptonêmico e da meiose convencional foram decisivas para excluir a existência de um mecanismo sexual XX/XY em *Leporinus lacustris* (MESTRINER et al., 1995), que de maneira similar àquela vista em *S. melanoderdatum* estava relacionada a diferenças estruturais dos cromossomos.

Em alguns estudos citogenéticos de peixes, já foi proposta a existência de sistemas cromossômicos sexuais, porém revisões posteriores com aplicação de técnicas mais resolutivas e análises com maior número de exemplares não corroboraram sua ocorrência. Em estudo desenvolvido por MICHELE e TAKAHASHI (1977) foi proposta a existência de um sistema cromossômico sexual XX/XY em *Geophagus brasiliensis*, após análises com impregnação por prata FELDEBERG e BERTOLLO (1985) e MARTINS et al., (1995), descobriram tratar-se de um polimorfismo associado ao heteromorfismo de tamanho das regiões organizadoras de nucléolo. De maneira similar GALETTI et al., (1981) descreveram um sistema sexual XX/XY para *Leporinus lacustris*. Análises de células meióticas e do complexo sinaptonêmico em maior número de exemplares, demonstraram que os cromossomos sexuais propostos possuíam comportamento meiótico padrão, porém condensação diferencial resultando em diferenças cromossômicas estruturais (MESTRINER et al. 1995).

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanoderdatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

Em *Imparfinis mirini*, VISSOTO et al., (1997) descreveram um sistema sexual ZZ/ZW analisando apenas seis exemplares, com a ampliação do número amostral para 176, constatou-se a existência de um polimorfismo cromossômico envolvendo a região heterocromática terminal no braço longo do par 10 (VISSOTO, 2000). Em *Hoplias lacerdae*, BERTOLLO et al. (1978) descreveram um sistema sexual XX/XY, que não foi posteriormente confirmado por MORELLI et al. (2007), após aplicação de bandamento C e fluorocromos base-específicos.

Além dos estudos com descrições de sistemas sexuais inexistentes, há na literatura relatos onde o sistema sexual estava presente, mas não foi detectado devido ao baixo número amostral analisado ou devido ausência de resolução das técnicas utilizadas. Nesse sentido podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por ALVES et al. (2003) e ALVES (2005) que ao analisarem apenas dois exemplares de *Hartia carvalhoi* (citada como *H. loricarifomes*), não conseguiram identificar um sistema cromossômico sexual múltiplo XX/XY₁Y₂, posteriormente verificado por CENTOFANTE et al. (2005), em exemplares da mesma espécie coletados na mesma localidade, com número amostral igual a 20. Caso semelhante ocorreu em *Gymnotus pantanal* descrita por FERNANDES et al. (2005) como uma nova espécie com 2n=40 cromossomos e fórmula cariotípica (7m/sm + 13st/a). SILVA e MARGARIDO (2005) ao analisarem 20 exemplares de *G. pantanal* (citado como *Gymnotus* sp.) verificaram números diplóides distintos entre os sexos com as fêmeas portando 2n= 40 cromossomos e os machos 2n=39 cromossomos, caracterizando assim uma heterogametia masculina com presença de um

sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. As diferentes descrições cariotípicas para *G. pantanal* provavelmente ocorreu pelo fato de que FERNANDES et al. (2005) descreveram o cariótipo da espécie baseados apenas em exemplares do sexo feminino. MOREIRA-FILHO et al. (1984, 1985) e JESUS e MOREIRA-FILHO (2000) ao analisarem a espécie *Apareiodon ibitiensis* descreveram sua estrutura cariotípica como sendo composta por $2n=54$ cromossomos para machos e fêmeas, mas BELLAFRONTE et al. (no prelo) ao utilizarem a técnica de bandamento C modificada com iodeto de propídeo, que resulta em melhor contraste entre as bandas e por isso numa melhor resolução do heteromorfismo cromossômico, caracterizaram uma heterogametia feminina e a identificação precisa de um sistema sexual do tipo ZZ/ZW em exemplares de diferentes populações provenientes de distintas bacias hidrográficas.

Assim os dados aqui levantados demonstram que o aperfeiçoamento das técnicas citogenéticas bem como o maior domínio destas na aplicação de problemas sobre evolução cariotípica aliada ao maior cuidado nas análises, possibilita a averiguação e o teste de hipóteses evolutivas. Foi com esse objetivo e na tentativa de elucidar a natureza do polimorfismo encontrado em *S. melanoderdatum*, foram isoladas duas sondas de DNAs repetitivos, obtidas por diferentes metodologias (Silva et al. em preparação). Entretanto, até o momento os resultados obtidos não permitiram a averiguação da hipótese de amplificação do cromossomo 9 pelo SINE da família *Alu*. Permanecendo desconhecido o evento evolutivo que deu origem a esse cromossomo submetacêntrico grande de *S. melanoderdatum*, presente tanto em machos

quanto em fêmeas, variável interindividualmente e polimórfico na amostra populacional nativa e nascida em cativeiro.

Outro polimorfismo comum entre os pimelodídeos e demais grupos de peixes neotropicais é aquele relacionado às RONS. (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; SWARÇA et al., 2001; CAPISTANO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008). Em *S. melanodermatum* foi observada ampla variação de tamanho, não só por atividade verificada pela prata coloidal, mas também pela localização de sequências de rDNA 18S por FISH, entre os homólogos que contém os cístrons ribossomais. Há indivíduos que apresentam o par da RON duplicado em ambos os cromossomos, entretanto a condição mais comumente observada é aquela em que apenas um cromossomo apresenta a duplicação. Essa condição representando o indivíduo heterozigoto, demonstra a existência de um polimorfismo estrutural. É uma questão aberta se a ausência de um dos homozigotos com as RONS duplicadas representaria uma desvantagem seletiva em *S. melanodermatum*. Em *Oncorhynchus mykiss*, PORTO-FORESTI et al., (2004), observaram um efeito letal gerado pela homozigose de um evento de inversão paracêntrica envolvendo as regiões organizadoras de nucléolo.

Em conclusão, embora a macroestrutura cariotípica de *S. melanodermatum* reflita um estado basal e conservado encontrado para a maioria dos peixes pimelodídeos, com número diplóide $2n=56$ cromossomos e número fundamental elevado, o genoma dessa espécie parece experimentar processos evolutivos relacionados ao acúmulo de sequências de DNA moderadamente repetitivo como verificado para as regiões 18S do rDNA e/ou as sequências altamente repetitivas a exemplo do SINE *Alu*, sugeridas no

Matoso, D. A.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R. F. Chromosomal polymorphism on *Steindachneridion melanodermatum* Garavello 2005, (Siluriformes, Pimelodidae) (em preparação).

presente artigo como situações polimórficas. Semelhante a alguns casos relatados acima o sistema de cromossomos sexuais XX/XY descrito por SWARÇA et al. (2006) para *S. melanodermatum*, trata de um polimorfismo cromossômico, uma vez que o presente trabalho evidencia que o heteromorfismo está presente em exemplares de ambos os sexos da população estudada.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da tese no item **Referências Bibliográficas**.

Figura 2.1 – (a) Exemplar de *Steindachneridion melanodermatum*. Caracterização sexual pela observação de tecido gonadal, (b) macho e (c) fêmea. Barra = 10 μ m.

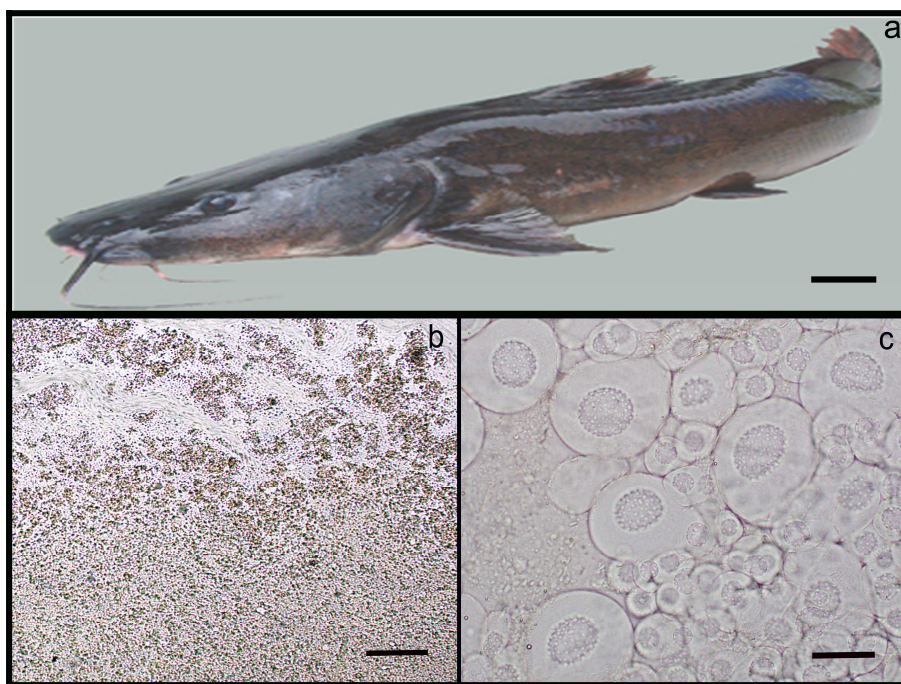


Figura 2.2 – Cariótipos de *S. melanodermatum*. (a, b) fêmea e macho com o polimorfismo. (c, d) fêmea e macho sem o polimorfismo. Observar a diferença acentuada de tamanho nos cromossomos submetacêntricos 9 e 14 nos exemplares com polimorfismo. Barra = 10 µm.

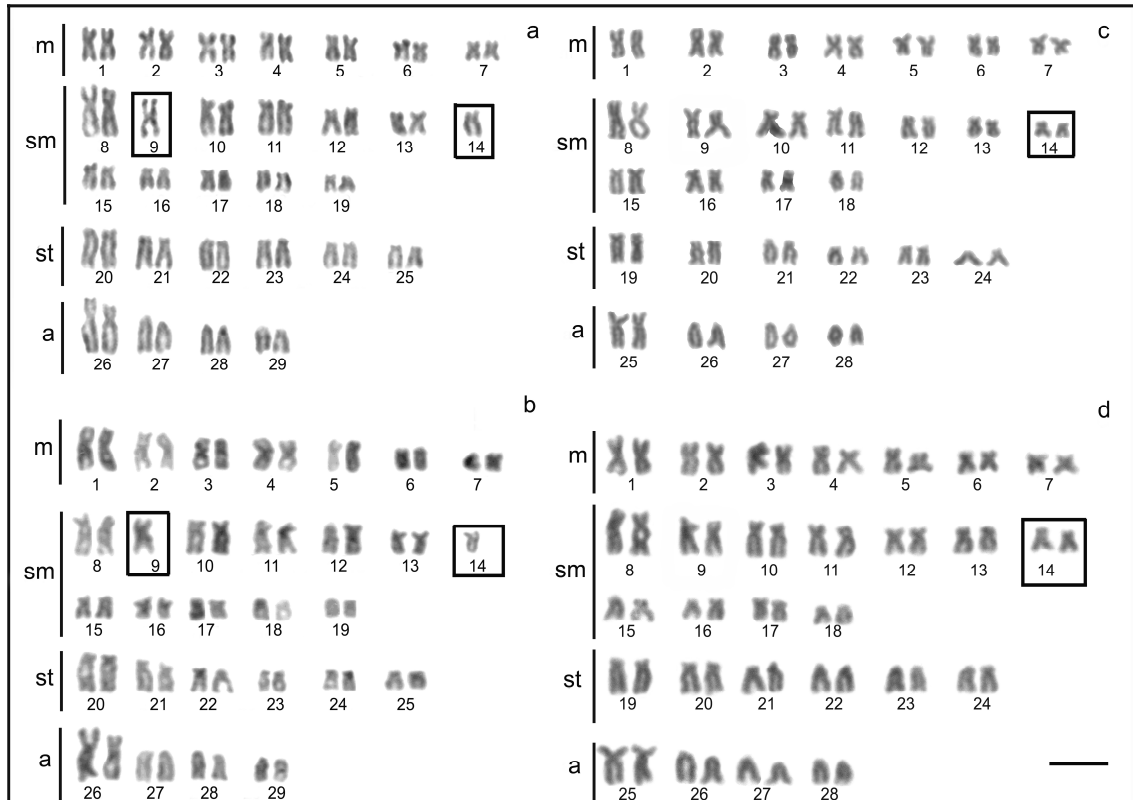


Figura 2.3 – Análise convencional de células meióticas de fêmea e macho de *S. melanodermatum*. (a-f) células de fêmea. (a) células em processo sincrônico de condensação no estágio de zigóteno tardio (abaixo) e paquíteno inicial (acima), (b) 28 cromossomos paquítenicos pareados ponta a ponta, (c) desenho esquemático sobre a imagem anterior do paquíteno, (d) diplóteno tardio (seta), (e) diacinese com visualização de quiasmas (seta), (f) fase de transição do diplóteno para a diacinese com a visualização de quiasmas (seta), (g – i) células de macho. (g) diplóteno, (h, i) diacinese com visualização de quiasmas (setas). Barra = 10 μ m.

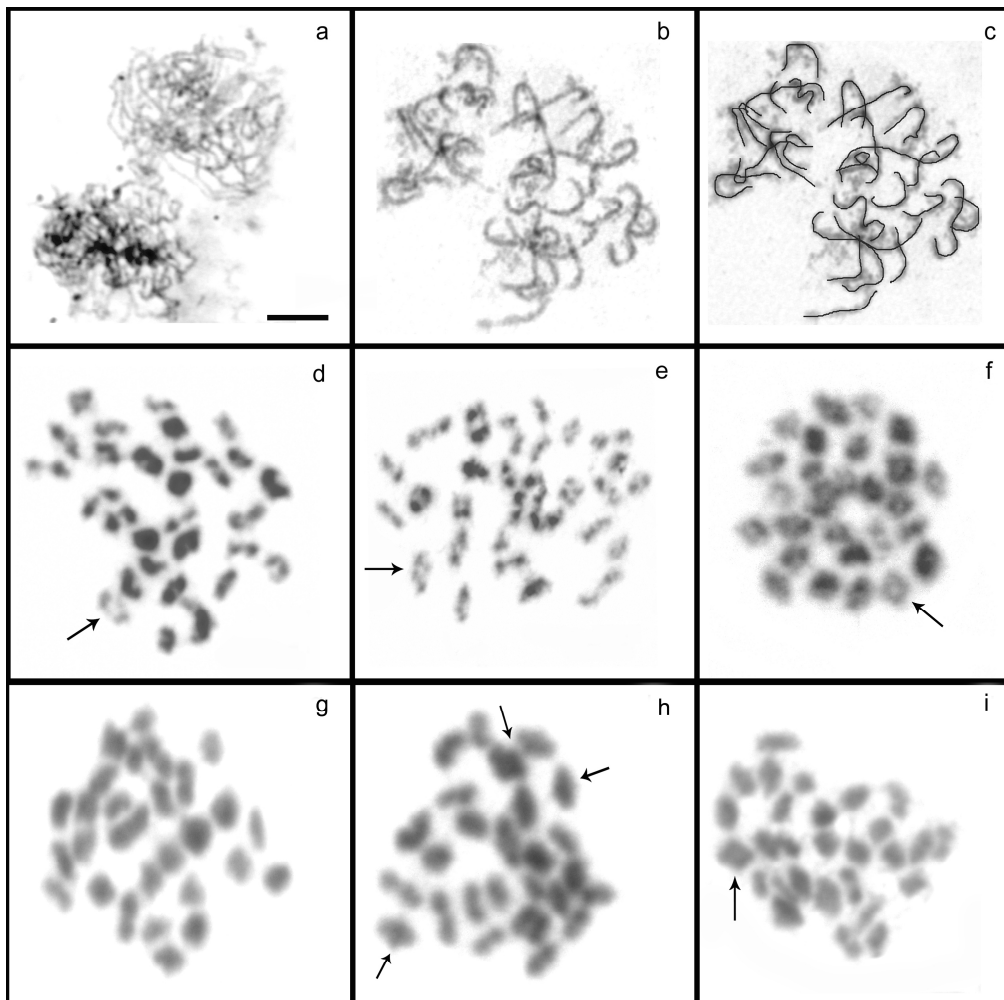


Figura 2.4 – (a) Cariótipo de exemplar macho sem o polimorfismo. Giemsa (acima) e banda C (abaixo). (b) Cariótipo de exemplar macho com o polimorfismo. Giemsa (acima) e Banda C (abaixo). Barra = 10 µm.

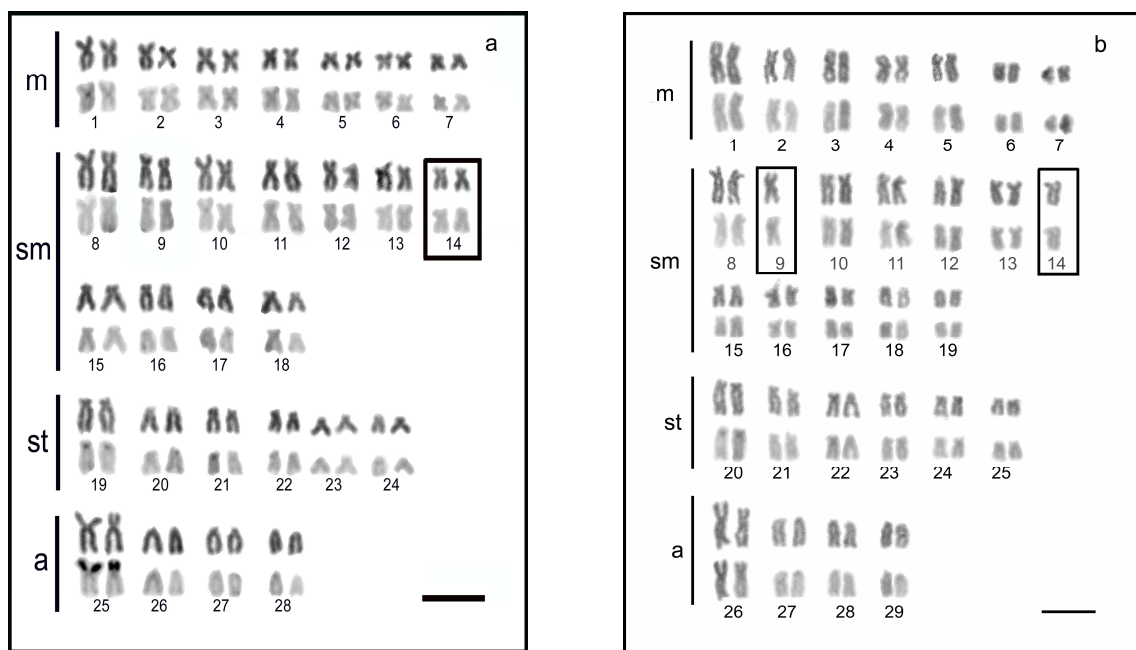


Figura 2.5 – Metáfase de fêmea evidenciando a localização das regiões 5S em rosa (setas menores) e 18S em verde (setas maiores). As regiões 5S estão presentes no par subtelocêntrico número 19 e as 18S no par acrocêntrico número 25. Observar o heteromorfismo de tamanho das regiões 18S. Barra = 10 μ m.

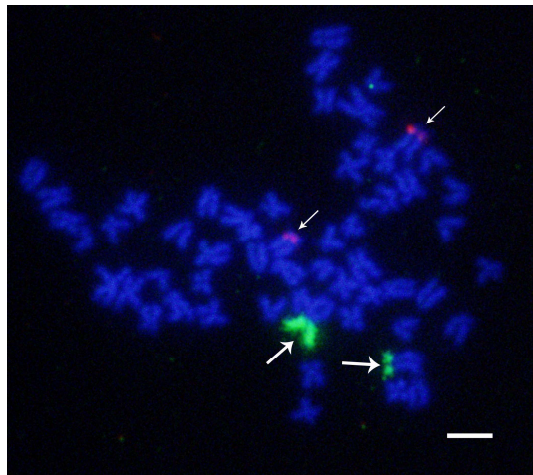


Figura 2.6 – Localização da região 5S e Ag-RON sequencial. (a, b) fêmea com polimorfismo, (c, d) fêmea sem polimorfismo, (e, f) macho com polimorfismo. Barra = 10 µm.

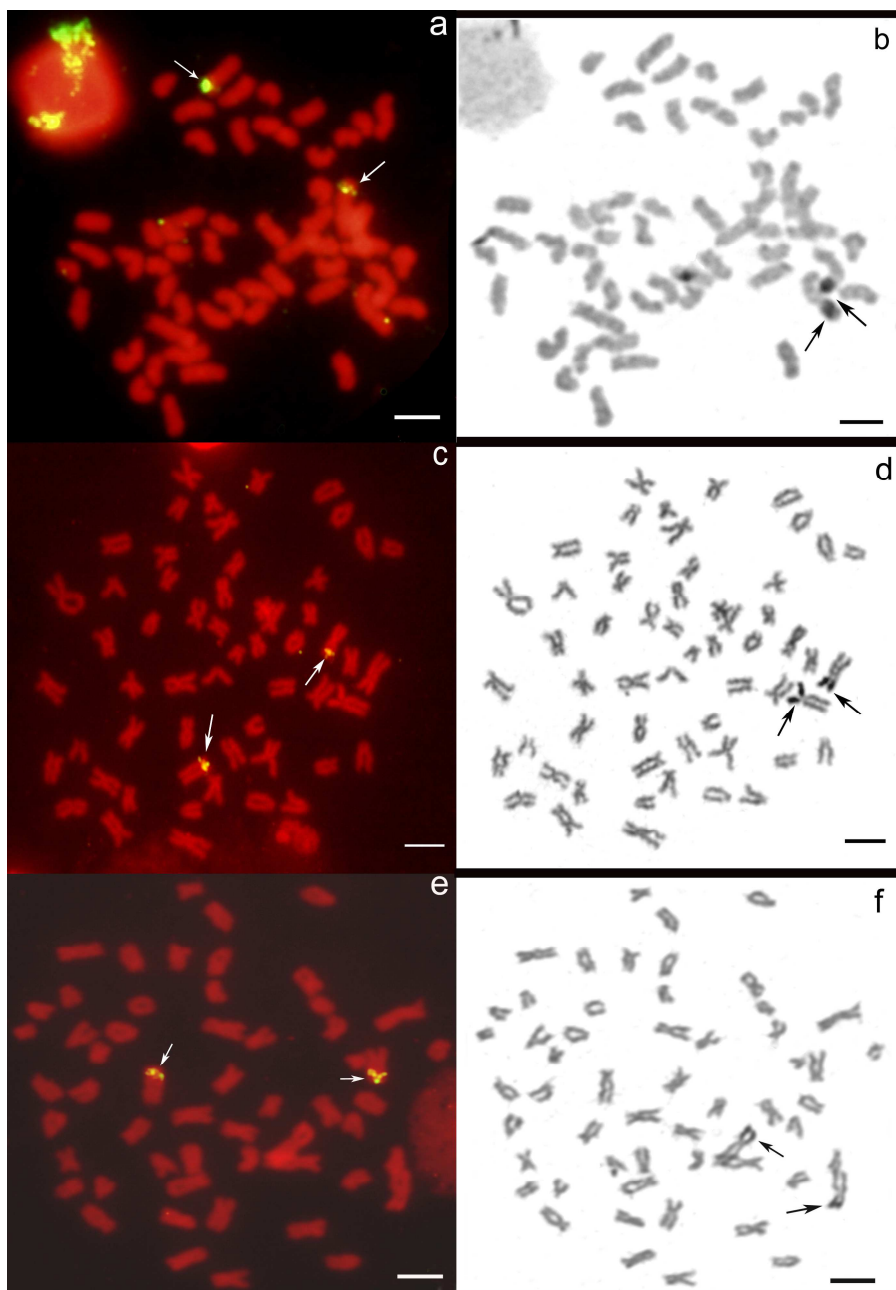
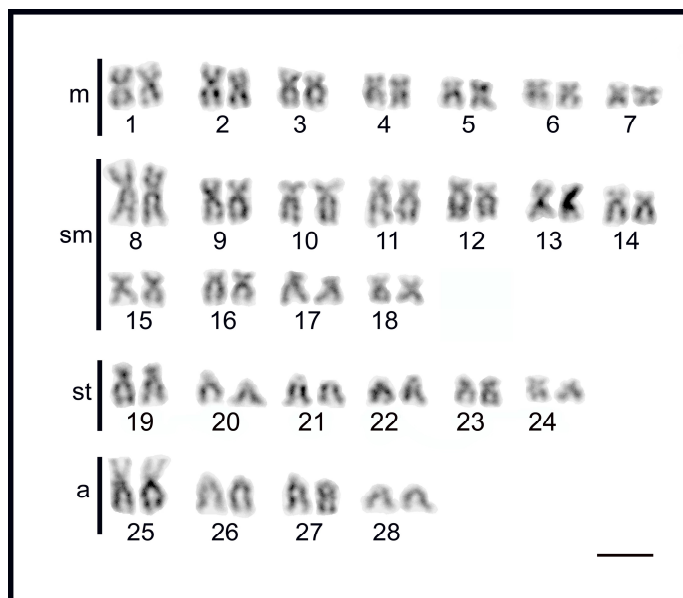


Figura 2.7 – Cariótipo de macho sem polimorfismo, após coloração com corante Wright mostrando padrão de bandas semelhantes ao bandamento G. Barra = 10 µm.



Capítulo III

Monitoramento da variabilidade genética em plantel selvagem e cultivado de *Steindachneridion melanodermatum* (Teleostei: Pimelodidae)

Abstract

Specimens of *Steindachneridion melanodermatum* caught in nature and born in captivity were analyzed regarding patterns of RAPD molecular markers. The genetic similarity ranged between 0.57 and 0.95 and two clusters were verified for the wild specimens. The results suggest the occurrence of different genetic stocks in the nature living in sympatry in Iguaçu River basin. The heterozygosity and percentage of polymorphic loci were 0.31 and 79%. For the wild specimens were 0.23 and 62% while for the ones born in captivity 0.26 and 66%, respectively.

Key words: RAPD, conservation, fish, surubim

Resumo

Exemplares de *Steindachneridion melanodermatum* coletados na natureza e nascidos em cativeiro foram analisados quanto ao padrão de marcadores moleculares RAPD. Os índices de similaridade genética variaram de 0,57 a 0,95 e dois agrupamentos foram verificados para os espécimes selvagens, sugerindo a ocorrência de estoques genéticos diferentes na natureza ou unidades taxonômicas distintas, vivendo em simpatria na bacia do Rio Iguaçu. Os valores de similaridade genética verificados para a espécie mostraram amplitude menor de variação quando comparados aos índices obtidos para exemplares da espécie congênere *S. scriptum*. A heterozigosidade e a porcentagem de *loci* polimórficos totais foram iguais a 0,31 e 79%. Nos exemplares selvagens foram iguais a 0,23 e 62% e para os exemplares nascidos em cativeiro 0,26 e 66%, respectivamente.

Palavras-chave: RAPD, conservação, peixes, surubim

Introdução

A conservação genética é uma estratégia de grande valor para quem trabalha com a biodiversidade (SOLE-CAVA, 2001), e uma abordagem de fundamental importância nesse campo de pesquisa é a determinação dos níveis de variabilidade genética em uma unidade reprodutiva local, seja para fins de conservação ou cruzamento em cativeiro (LEUZZI et al., 2004).

A construção de barragens para a construção de hidroelétricas é um dos mais sérios problemas de mudanças ambientais para as espécies terrestres e aquáticas. Em peixes, o fator mais impactante talvez seja a modificação nos padrões de dispersão de espécies migratórias que sob determinadas condições não conseguem se adaptar a essas mudanças e acabam reduzindo o fluxo gênico e alterando os componentes da diversidade (AGOSTINHO et al., 1992; VRIJENHOEK, 1998).

Steindachneridion melanodermatum é uma espécie de grande bagre, migrador na fase inicial de seu desenvolvimento, endêmico a bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Exemplares da natureza foram coletados e mantidos em cativeiro como plantel para reprodução na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos em Salto Segredo no Paraná. No presente estudo, foram empregados marcadores moleculares RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) em exemplares provenientes da natureza (matrizes) e exemplares nascidos no programa de conservação genética e repovoamento desenvolvido pela Companhia Paranaense de Energia Elétrica (COPEL) da Usina Nei Braga em Salto Segredo. O objetivo deste estudo foi determinar o nível de variabilidade genética encontrado nesses exemplares, na intenção de gerar informações que

otimizem seu cultivo em cativeiro, e que melhor oriente a conservação da espécie fornecendo subsídios para a implantação de estratégias de manejo adequadas à conservação da variabilidade genética *in situ*.

Material e Métodos

Exemplares de *Steindachneridion melanoderdatum* capturados na natureza (n = 13) e nascidos em cativeiro (n = 17) foram submetidos à análise genética por marcadores RAPD. A extração de DNA seguiu o protocolo de SAMBROOK et al (1989).

Os dados foram inseridos numa matriz binária conforme a presença ou ausência de fragmentos observados no gel, assumindo-se que alelos de diferentes *loci* migram para posições diferentes no gel e que cada banda representa um locus Mendeliano de caráter dominante que se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o alelo nulo recessivo não visível (LYNCH e MILLIGAN, 1994). Para a obtenção dos marcadores RAPD foi utilizado o kit Ready-to-go RAPD Analysis Beads (GE Healthcare) que contém seis *primers* de 10mer de sequências arbitrárias na concentração de 2.5 nmol cada. As seguintes sequências de *primers* foram usadas na amplificação: *primer 1* (5' d[GGTGCGGGAA] 3'), *primer 2* (5' d[GTTTCGCTCC] 3'), *primer 3* (5' d[GTAGACCCGT] 3'); *primer 4* (5' d[AAGAGCCCGT] 3'), *primer 5* (5' d[AACGCGCAAC] 3'), *primer 6* (5' d[CCCGTCAGCA] 3'). O *primer 2* foi excluído da análise porque forneceu poucos marcadores e quase todos monomórficos. O perfil de reação usado para todos os *primers* foi: 1 ciclo a 95° por 5 minutos, 45 ciclos a 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto, 72°C por 2

minutos. A reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) foi realizada contendo 5 µl de cada *primer* (25 pMol), 2 µl de DNA molde (5 ng/ µl), 18 µl de água ultra pura autoclavada. Todas as reações foram executadas com um DNA controle fornecido pelo Kit e as diluições para obtenção das concentrações desejadas foram realizadas conforme as instruções do fabricante. Para cada *primer* foi realizada uma segunda PCR com alguns exemplares selecionados ao acaso, para fins de reprodutibilidade do padrão eletroforético obtido. Indivíduos cujos perfis de bandas não foram resolutivos tiveram suas PCRs repetidas para a inclusão nas análises estatísticas, ou foram excluídos porque não mantiveram consistência no perfil de bandas apresentado. Esse foi o caso dos espécimes selvagens 1248, 1251 e 1255 que tiveram suas PCRs falhas na amplificação dos *primers* 1, 3, 5 e 6, embora tenham amplificado bem com o *primer* 4 (Figura 3.2).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% a 100 Volts (\approx 80 mA) por 4h e 45 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídio 1% (10mg/ml). Cada banda teve sua massa molecular determinada usando um marcador de massa molecular de 100pb (Biotec Ludwig), como parâmetro. As PCRs foram executadas em um termociclador PTC-100 da MJ Research.

O programa NTSYS-PC versão 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 2000) foi utilizado para estimar o nível de similaridade genética intrapopulacional através do coeficiente de JACCARD (1901). Análises de agrupamento foram realizadas pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average) (SNEATH e

SOKAL, 1973). Os valores de *bootstrap* foram obtidos com o programa BOOD versão 3.03 (COELHO, 2004). Os valores de heterozigosidade, porcentagem de *loci* polimórficos, distância e identidade de NEI (1972,1978), análise de estruturação e teste exato de diferenciação populacional, foram obtidos através do programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997).

Resultados e Discussão

Os cinco *primers* utilizados nesse estudo produziram 53 fragmentos em gel, 15.1% se constituíram em bandas monomórficas e 84.90% em bandas polimórficas. O tamanho dos fragmentos variou entre 200 e 2000 pb e o número das bandas variou de 1 a 16. A similaridade genética variou de 0.57 a 0.95. Num estudo desenvolvido por RAMELLA et al. (2006) para exemplares de *S. scriptum* do rio Uruguai, foram observados valores de similaridade genética com amplitude de 0.0 a 1.00, indicando um maior nível de diversidade em somente 13 exemplares examinados, quando comparados aos 27 exemplares analisados no presente estudo com intervalo de variação entre 0.57 a 0.95. Esse dado parece indicar perda de diversidade genética em *S. melanodermatum*, embora nenhum outro estudo tenha sido desenvolvido para essa espécie como parâmetro comparativo para os dados aqui levantados.

O fenograma gerado pelo UPGMA agrupou os indivíduos de forma fragmentada com a formação de três clados e valores de similaridade genética variáveis (Figura 3.1). Nessa análise foram obtidos dois distintos agrupamentos para os exemplares selvagens, indicando que pode haver na natureza diferentes estoques populacionais geneticamente diferenciados vivendo em

simpatria, ou ainda, a existência de mais de uma unidade taxonômica. O polimorfismo cromossômico encontrado para essa espécie parece corroborar a primeira hipótese (Matoso et al., em preparação). No mesmo sentido, os estoques mantidos como matrizes de reprodução e os exemplares nascidos em cativeiro também apresentam diferenciação genética entre si.

Para fins de determinação de parâmetros mais conclusivos o estoque foi subdividido em amostra 1 (n=8 exemplares selvagens) e 2 (n=19 exemplares cultivados). Os valores de heterozigosidade e porcentagem de *loci* polimórficos foram calculados para ambas as amostras (Tabela 3.1).

A distância genética e a identidade genética de NEI (1978) corrigidas foram iguais a 0,1096 e 0,8962, respectivamente, correspondendo a um valor equivalente a espécies do mesmo gênero de acordo com o índice de identidade obtido por THORPE (1982) em *Salminus brasiliensis*. O teste exato de diferenciação populacional forneceu alto valor de qui-quadrado e p altamente significativo ($X^2 = 148$ p = 0,0041), com diferenças entre as amostras testadas, mesmo quando analisadas conjuntamente. Esse teste foi congruente com o índice estruturação populacional theta (θ_{st}) que foi igual a 0,2313 correspondendo a um moderado valor de estruturação genética de acordo com a estatística F de WRIGHT (1978).

De acordo com os resultados aqui apresentados, a variação genética total de *S. melanodermatum*, não está comprometida como verificado pela porcentagem de *loci* polimórficos e o índice de heterozigosidade total (Tabela 3.1). Apesar disso a amplitude da variação genética existente é

consideravelmente baixa quando comparada aos valores de similaridade genética obtidos para *Steindachneridion scriptum* (RAMELLA et al., 2006).

Embora o programa de cultivo em cativeiro de *S. melanodermatum* da Estação Experimental de Salto Segredo – COPEL possa ser considerado bem estabelecido quanto às variáveis ecológicas como nutrição e reprodução induzida (LUDWIG et al., 2005), a falta de dados genéticos acerca do estoque mantido como matrizes e reprodutores em cativeiro, e o número de exemplares utilizados nos cruzamentos pode futuramente potencializar a ação da deriva genética diminuindo a diversidade nas gerações futuras. De acordo com WASKO et al. (2004), uma maneira de minimizar os danos causados pela baixa variabilidade genética dos estoques cultivados é genotipar reprodutores potenciais e cruzar os que possuam maior divergência entre si ou retrocruzar exemplares cultivados com selvagens. Essa estratégia é eficaz quando os intercruzantes fazem parte do mesmo agrupamento genético. Por isso determinar o genótipo de todo o estoque reprodutor é importante para evitar introgressão gênica nas populações que já estão estruturadas ou geneticamente diferenciadas.

O monitoramento genético de peixes é uma ferramenta extremamente útil para programas de conservação ou repovoamento, mas são ainda recentes as abordagens que utilizam técnicas genéticas para a avaliação dos estoques selvagens e cultivados em espécies Neotropicais. WASKO et al. (2004) analisando quatro estoques (um selvagem e três cultivados) de *Brycon cephalus*, do programa de conservação genética do CEPTA/IBAMA, encontraram diferenças significativas na composição genética dos mesmos

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C.; Silva, M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Artoni, R. F. Monitoring genetic variability on wild and hatchery stocks of *Steindachneridion melanodermatum* (Teleostei:Pimelodidae) (submetido).

quanto à porcentagem de *loci* polimórficos e índice de similaridade genética, sendo estes consideravelmente superiores no estoque selvagem. No presente estudo a baixa heterozigosidade e a porcentagem de *loci* polimórficos verificada no estoque reprodutor pode não estar refletindo o quadro natural das populações selvagens dado ao pequeno número amostral analisado. No entanto se considerarmos esse resultado como representativo do cenário encontrado na natureza ele pode ser explicado pela dispersão limitada dos espécimes de *S. melanodermatum* devido comprometimento de seu *habitat* natural ou devido a características comportamentais típicas da espécie em sua fase adulta. Contudo, não foi objeto do presente estudo realizar uma ampla investigação acerca destes parâmetros nesta espécie na natureza e sim em relação à composição dos exemplares utilizados em ensaios de reprodução induzida, aleatoriamente, em relação às gerações segregantes F1.

Em peixes a técnica de RAPD é utilizada em abordagens que objetivam o monitoramento genético de estoques populacionais (WASKO et al. 2004), a identificação de espécies e estoques reprodutores (PARTIS e WELLS, 1996; PRIOLI et al., 2002; ALI et al., 2004), a análise de estruturamento de populações naturais (ALMEIDA et al., 2003; WASKO et al., 2002; HATANAKA e GALETTI 2003; LEUZZI et al., 2004; MATOSO et al. 2004; SOFIA et al., 2006) e a variabilidade genética em populações ou espécies ainda não estudadas do ponto de vista genético (RAMELLA et al., 2006). Em outros grupos os marcadores RAPD vem sendo combinados a metodologias de caráter menos arbitrário para gerar padrões de DNA mais definidos denominados DNA *fingerprinting* para fins de caracterização molecular

(AGGARWAL et al., 2008) e ou análise da diversidade genética (BRAHMANE et al., 2008; RABELLO et al., 2008).

Apesar da técnica de RAPD não prover informação acurada quanto ao genótipo específico dos espécimes analisados e do caráter dominante do marcador, ela é uma ferramenta rápida e barata que permite o acesso à informação sobre a variabilidade genética geral dentro e entre populações, mesmo considerando que a variação observada pode estar sendo subestimada (Figura 3.2).

Diante da necessidade de manejo geneticamente orientado para os estoques em cativeiro de *S. melanodermatum*, os resultados aqui apresentados apontam para a necessidade de continuidade do programa com o objetivo de possibilitar a conservação da espécie através de cruzamentos programados e ampliação da informação acerca da variabilidade genética existente em populações naturais.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da tese no item **Referências Bibliográficas**.

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C.; Silva, M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Cestari, M. M.; Artoni, R. F. Monitoring genetic variability on wild and hatchery stocks of *Steindachneridion melanodermatum* (Teleostei:Pimelodidae) (submetido).

Figura 3.1 – Fenograma obtido com similaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA para exemplares de *S. melanodermatum*. M= matrizes de reprodução capturadas na natureza.

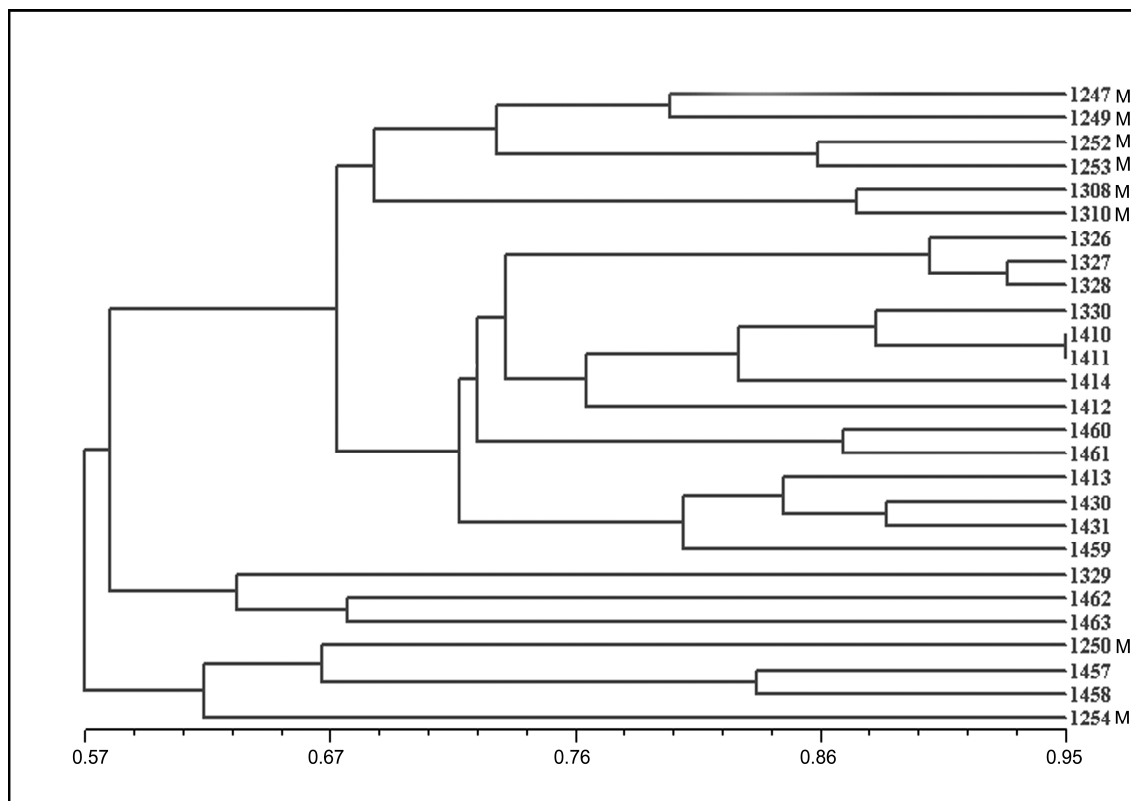


Figura 3.2 – Padrão de bandas obtido por marcadores RAPD para o primer 4 em *S. melanodermatum*.

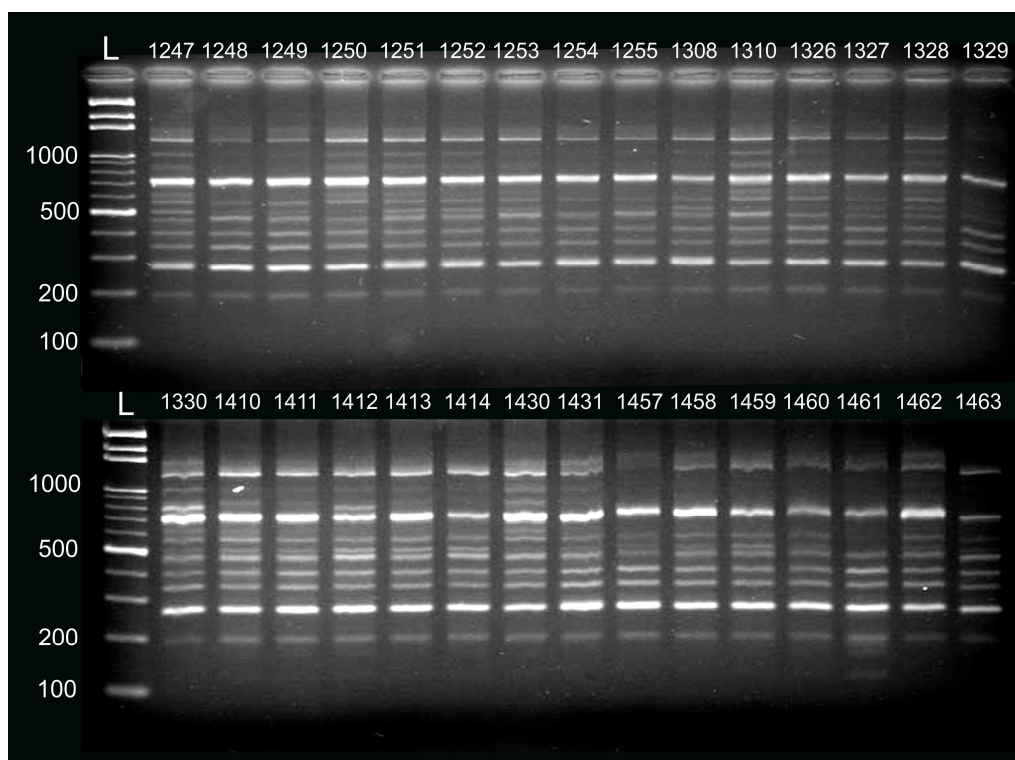


Tabela 3.1 – Valores de Heterozigosidade (H) e porcentagem de loci polimórficos em amostras de *S. melanodermatum*.

	amostra 1 selvagem (n=8)	amostra 2 cultivada (n=19)	amostra inteira (n=27)
H	0,23	0,26	0,31
% loci polimórficos	62,26	66,03	79,24

Capítulo IV

Diferenciação genética em duas populações alopátricas de *Steindachneridion scriptum*: especiação incipiente ou variação geográfica?

Abstract

Analyses sequences D-Loop mtDNA region were performed on four genus of catfish. The samples of *Steindachneridion scriptum* from Tibagi and Uruguay Rivers were phylogenetically compared with *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Sorubim lima* e *Zungaro Zungaro*. Three methods were applied (Bayesian Inference, Maximum Likelihood and Parsimony). The topologies obtained were similar. *Steindachneridion scriptum* both localities were considered the same taxonomical unit but that are in incipient process of genetic differentiation and speciation. Strategies for the maintenance of population genetic variability were also suggested

Key-words: Molecular evolution, Pimelodidae, Phylogenetic Inference, Genetics conservation

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Resumo

Foram realizadas análises de sequenciamento da região D-loop do mtDNA em espécimes de quatro gêneros de grandes bagres. Amostras de *Steindachneridion scriptum* do Rio Tibagi e Rio Uruguai foram filogeneticamente comparadas com *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Sorubim lima* e *Zungaro zungaro*. Três métodos foram aplicados (Inferência Bayesiana, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia) e duas topologias muito similares foram obtidas. *Steindachneridion scriptum* de ambas as localidades foram consideradas uma mesma unidade taxonômica que estão em incipiente processo de diferenciação genética e especiação. Foram também sugeridas estratégias para a manutenção da variabilidade genética populacional.

Palavras-chave: Evolução molecular, Pimelodidae, Inferência filogenética, Conservação genética.

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Introdução

O *status* filogenético dos Pimelodídeos bem como sua monofilia tem sido assunto recorrente na literatura de grandes bagres Neotropicais. A monofilia da família Pimelodidae não tem sido suportada pelos estudos baseados em marcadores morfológicos, e atualmente são reconhecidos três grupos monofiléticos bem definidos: Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimleodidae. Os pimelodídeos são o grupo mais amplo que compõem os grandes bagres, sendo compostos principalmente por espécies predadoras de relevante importância para a pesca e as comunidades ribeirinhas. Estes peixes possuem corpo coberto por couro, apresentam grande variação no tamanho e na cor e nenhum dimorfismo sexual (GARAVELLO, 2005).

Os grandes bagres informalmente conhecidos como “Sorubimíneos” (*Sorubim*, *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma*, *Zungaro*, *Steindachneridion*) constituem uma das maiores politomias da filogenia da família Pimelodidae (PINNA, 1998). *Steindachneridion* é um gênero endêmico das bacias hidrográficas brasileiras do leste, filogeneticamente relacionado ao gênero *Zungaro* o qual está amplamente distribuído pelas bacias hidrográficas Amazônica e do Prata (LUNDBERG, 1998). A mais recente revisão de *Steindachneridion* foi realizada por GARAVELLO (2005) e SHIBATTA e BOCKMANN (2007), quem sugeriram a ocorrência de seis espécies para o gênero: *S. amblyurum* endêmica do Rio Jequitinhonha, *S. doceanum* endêmica do Rio Doce, *S. parahybae* endêmica do Rio Paraíba do Sul, *S.*

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

melanodermatum endêmica do Rio Iguaçu e as espécies *S. scriptum* e *S. punctatum* com maior distribuição na bacia do Paraná.

Para tentar elucidar ou melhor estabelecer as relações filogenéticas em uma espécie de *Steindachneridion* especificamente em *S. scriptum* do Rio Tibagi e do Rio Uruguai foram aplicados três diferentes métodos de inferência filogenética em duas populações desta espécie. Uma análise comparativa foi executada para verificar o nível de divergência genética entre estas populações e seus padrões evolutivos.

Material e Métodos

Os espécimes foram taxonomicamente identificados de acordo com GARAVELLO (2005) e as amostras de tecido dos exemplares do rio Tibagi foram providas pelo Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa – LCEUEPG. Os espécimes foram capturados entre junho de 2000 e julho de 2005 na região do alto rio Tibagi a montante da represa Presidente Vargas, Paraná, Brasil. As amostras de tecido dos exemplares do rio Uruguai foram providas pelo Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce da Universidade Federal de Santa Catarina – LAPAD. Os espécimes foram capturados entre julho de 1995 e junho de 2002 na região do alto rio Uruguai a jusante da represa Machadinho, Santa Catarina, Brasil. O número de depósito dos espécimes do rio Tibagi são: 1113LCEUEPG, 1465LCEUEPG, 1466LCEUEPG, 1467LCEUEPG, 1468LCEUEPG, 1469LCEUEPG e dos espécimes do rio Uruguai são: 21LAPAD38,

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

23LAPAD56, 23LAPAD63, 24LAPAD107, 25LAPAD75, 25LAPAD76, 25LAPAD76, 25LAPAD78, 25LAPAD79, 1261LCEUEPG. Amostras de músculo e nadadeira de um espécime de *Zungaro zungaro*, um espécime de *Sorubim lima*, 10 de *Steindachneridion scriptum* do Rio Uruguai e seis do Rio Tibagi foram coletadas e usadas para a extração de DNA seguindo a metodologia descrita por SAMBROOK et al., (1989). A região D-loop inteira foi sequenciada usando 5 ng of DNA, 1.5 mM MgCl₂, solução tampão 1x, 200 µM de cada dNTP, 0.5 U de DNA *Taq* polimerase e 0.5 µM de cada primer (FTTF: 5'CAA AGC GCC GGT CTT 3' e F12R 5'GTC AGG ACC ATG CCT TTG3') (SIVASUNDAR et al., 2001).

A PCR foi inicialmente realizada em cinco ciclos, com desnaturação de um minuto a 94°C, hibridização a 53°C por um minuto e alongação a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido por 25 ciclos a 50°C para o passo de hibridização. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador modelo PTC-100 da MJ Research. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0.8% usando o fago λ como marcador de massa molecular.

As amostras foram purificadas com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE HealthCare) e sequenciadas com o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE HealthCare) seguindo as instruções do fabricante. Todos os DNAs moldes (templates) foram sequenciados em ambas as direções em um sequenciador MEGABACE (GE HealthCare). As imagens

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

foram documentadas pelo sistema de análise e documentação de eletroforese da Kodak (EDAS) 290.

Uma sequência D-Loop adicional de *Brachyplatystoma rousseauxii* com número de acesso DQ779046 (BATISTA e ALVES-GOMES, 2006) foi retirada do Genbank. As sequências D-Loop foram alinhadas e editadas pelo programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) usando os seguintes parâmetros nos alinhamentos: 6.66 e 10.0 para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente nos alinhamentos par-a-par e 10.0 e 15.0 para abertura e extensão de *gaps* nos alinhamentos múltiplos. As comparações par a par, informações estatísticas e as análises filogenéticas foram conduzidas pelo uso dos programas computacionais PAUP v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002), MRBAYES v.3.1.2 (RONQUIST e HUELSENBECK, 1991) e MEGA 3.0 (KUMAR et al., 2004). As inferências filogenéticas foram executadas com diferentes abordagens usando os métodos de Inferência Bayesiana (Bayesian Inference – BI) (YANG e RANNALA, 1997), Parcimônia (Parsimony – P) (FITCH, 1977) e Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) (FELSENSTEIN, 1981). As análises filogenéticas foram executadas usando as sequências de *B. rousseauxii*, *S. lima* e *Z. zungaro* como grupo externo.

O programa MODELTEST 3.7 (POSADA e CRANDALL, 1998) foi usado para determinar o modelo ótimo de evolução nucleotídica para esse conjunto de dados. Assim, a análise de ML foi realizada com o modelo evolutivo proposto por Hasegawa-Kishino-Yano 85 corrigido pela distribuição gamma (HKY85+Gamma) (RODRIGUEZ et al., 1990). Buscas heurísticas foram

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

conduzidas pelo método de adição de taxon stepwise com 10.000 replicações, combinadas com o método TBR (tree-bisection-reconnection) como algoritmo de troca de braços (ramos) da árvore. Análises *Bootstrap* com 10.000 replicações foram também executadas para acessar a robustez dos ramos e a confiância da topologia obtida.

A análise Bayesiana foi executada com o uso de 1.000.000 de gerações, usando 25% (225 caracteres) como o valor de *burnin*. Uma análise adicional foi executada no programa MEGA, baseada na distância de Tamura–Nei (TN) (TAMURA e NEI, 1993) que inclui o método HKY85 (HASEGAWA et al., 1984, 1985) e a distribuição Gamma para obter a divergência genética par a par.

Resultados

As sequências alinhadas totalizaram 901bp de comprimento, dos quais 558bp foram constantes, 159bp não foram caracteres informativos para parcimônia e 184bp foram informativos. O teste de probabilidade hierárquica, obtido do Modeltest indicou o modelo HKY85 + Gamma como o melhor modelo de evolução molecular seguindo a estimativa do valor de AKAIKE (AIC). O parâmetro alfa foi igual 1.0181 e a frequência de bases foi de A=0.3249, C=0.2007, G=0.1377, e T=0.3368. A proporção de transições sobre transversões (Ts/Tv) foi igual a 1.0731.

A divergência genética resultante das comparações par a par, variou 0.001 (0.1%) entre os espécimens 2 e 8 do Rio Uruguai até 0.404 (40%) entre o

espécime de *S. lima* (grupo externo) e o espécime 1 de *S. scriptum* do Rio Uruguai (Tabela 4.1).

As análises de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) forneceram topologias similares com altos valores de probabilidades a posteriori e coeficientes derivados da análise *bootstrap*. Pela análise de Parcimônia (P) o clado formado por *Z. zungaro* e *S. lima*, bem como, as relações internas para os espécimes do Rio Uruguai foram mantidas, e uma politomia foi observada para os espécimes do Rio Tibagi. Nas três abordagens *B. rousseauxii* não agrupou com qualquer espécimen (Figura 4.1).

Uma maior proporção de nucleotídeos AT foi observada em relação aos nucleotídeos CG e muitos *gaps* na porção inicial da região D-Loop foi verificada. A alteração de tamanho da região D-loop entre as espécies foi a característica mais marcante entre as sequências aqui analisadas (Figura 4.2).

Discussão

Apesar dos vários indicadores positivos, a sistemática dos grandes bagres Neotropicais é ainda deficiente em um considerável número de aspectos e a identificação em nível específico é difícil ou quase impossível em muitos casos (PINNA, 1998). Nesse contexto diversas abordagens incluindo o sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais (RUTA et al., 2007), bem como dados morfológicos (CHAN et al., 2007) têm sido combinados na tentativa de solucionar relações filogenéticas incertas para um ilimitado número de táxons. As amostras de *S. scriptum* do Rio Uruguai e Rio Tibagi pertencem à

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

mesma espécie, uma conclusão suportada pelos baixos índices de divergência genética entre as populações (Tabela 4.1), e os cladogramas observados nas três análises (Figura 4.1). As topologias mostram claramente que existe maior homogeneidade entre os espécimes do Rio Uruguai que entre os espécimes do Rio Tibagi evidenciando uma tendência à diferenciação desses grupos. Além disso, a população do Rio Uruguai parece possuir uma história evolutiva mais curta que a população do Rio Tibagi de acordo com a análise de comprimento de ramos. Portanto *S. scriptum* destas localidades poderiam estar em processo de especiação incipiente.

Até o momento, *S. scriptum* tem apresentado baixa divergência genética e alta similaridade dos espécimes do rio Uruguai como também observado por RAMELLA et al., (2006) num estudo com marcadores RAPD. De acordo com aqueles autores seis indivíduos coletados no mesmo sítio mostraram índice de similaridade igual a 1.00 e agruparam em dois diferentes grupos sugerindo uma estruturação populacional de *S. scriptum* no Rio Uruguai. Essa perda de variação genética poderia ser devido a pressões antropogênicas e ambiental. SWARÇA et al., (2005) argumenta que as espécies de *Steindachneridion* sofrem intensa pressão antrópica através da modificação de seu *habitat* e sobre pesca, desta forma, algumas dessas espécies estariam praticamente extintas de sua área original de distribuição. Assim, especificamente para o Rio Uruguai a menor variação genética seria explicada por uma intensiva pressão ambiental, visto que este rio possui diversas barragens ao longo de sua extensão, o que também explicaria os altos índices de similaridade dessa

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

população (RAMELLA et al., 2006). Por outro lado, a baixa divergência encontrada para os espécimes do Rio Tibagi poderia ser resultado de pressão antrópica pela agricultura ou sobrepesca (ARTONI e ALMEIDA, 2002), ou ainda uma disruptura natural da população, visto que esta espécie está restrita a um *habitat* simples embora realize migração durante o período reprodutivo (AGOSTINHO et al., 1997). A pouca variação genética pode também estar relacionada à própria história evolutiva da espécie, notavelmente conservada para os padrões morfológicos e citogenéticos (GARAVELLO, 2005; SWARÇA et al., 2003, 2005).

O estruturamento populacional em espécies de peixes migratórias é um aspecto marcante em rios que sofreram barramento. WASKO e GALETTI (2002), analisando populações de *Brycon lundii*, sugeriram um modelo de estruturação populacional baseado em dados de RAPD. Os autores analisaram espécimes coletados à montante e à jusante de uma barragem no Rio São Francisco e chamaram essas de regiões A e B. Eles concluíram que nestas áreas (A e B) havia dois diferentes estoques de peixes e na região B havia pelo menos duas populações ocorrentes que apresentavam comportamento comigratório durante o período reprodutivo.

Um estudo similar desenvolvido por HATANAKA e GALETTI (2003), em *Prochilodus margravii*, chamou a atenção para o estruturamento populacional causado por fatores ecológicos, evolutivos e históricos. BATISTA e ALVES-GOMES (2006), por outro lado, não encontraram qualquer estruturação populacional no grande bagre migrador *Brachyplatystoma rousseauxii* da bacia

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

hidrográfica do Sistema de Rios Solimões–Amazonas, o qual não possui barragens ao longo dele.

Independentemente das causas que levaram a baixa variação genética em *S. scriptum*, os resultados da presente abordagem apontam para a necessidade de manutenção de *habitats* apropriados para a reprodução e sobrevivência de *S. scriptum* de ambas as bacias hidrográficas, uma vez que essa espécie apresenta grande importância ecológica e econômica. Além disso, a variabilidade genética é a matéria prima dos processos evolutivos e, portanto nesse momento é necessário pensar em medidas estratégicas que visem a manutenção da variabilidade genética existente ou aumentem-na.

Nesse contexto algumas estratégias de manejo poderiam ser executadas na espécie *S. scriptum*: genotipagem de um grande número de espécimes selvagens, intercruzamento dos espécimes com diferentes genótipos de uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (OTU), cultivo do maior número possível desses indivíduos com sua posterior liberação na natureza. Proibição da pesca e da captura de animais com medidas mínimas de peso e tamanho de carcaça. Restauração de áreas desejáveis de relevante importância para a conservação da espécie.

Quanto à análise filogenética realizada com este conjunto de dados, foi observada uma politomia formada por *S. lima*, *Z. zungaro* e *B. rousseauxii* com demais espécies. Resultado que concorda com a topologia disponível por PINNA (1998), obtida com marcadores morfológicos. Em relação aos aspectos evolutivos das sequências D–Loop foi verificada grande quantidade de *gaps*

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

nas sequências de *S. scriptum* em relação às sequências do grupo externo (*S. lima*, *Z. zungaro* e *B. rousseauxii*), revelando um aspecto evolutivo mais dinâmico para as sequências D-Loop do mtDNA de *S. scriptum* considerando o padrão conservado de sua macroestrutura cariotípica (SWARÇA, 2003).

Dessa forma, as populações de *S. scriptum* com distribuição alopátrica nas bacias dos Rios Tibagi e Uruguai fazem parte de um mesmo clado, mas estão passando por um processo incipiente de diferenciação e especiação. Além disso, a variabilidade genética nessas populações parece estar em níveis perigosos para a manutenção destas em seus *habitats* naturais e por isso medidas de restauração dessa variabilidade seriam úteis para a conservação da espécie.

Tabela 4.1 – Distâncias genéticas baseadas em comparações par-a-par obtidas pelo método de Tamura-Nei em populações de *Steindachneridion scriptum* (Rios Uruguai e Tibagi) e sequências do grupo externo (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Zungaro zungaro*, *Sorubim lima*), considerando transições e transversões e distribuição gamma. UR= Rio Uruguai, TB= Rio Tibagi, Brac= *Brachyplatystoma rousseauxii*, Soru= *Sorubim lima*, Zun=*Zungaro zungaro*.

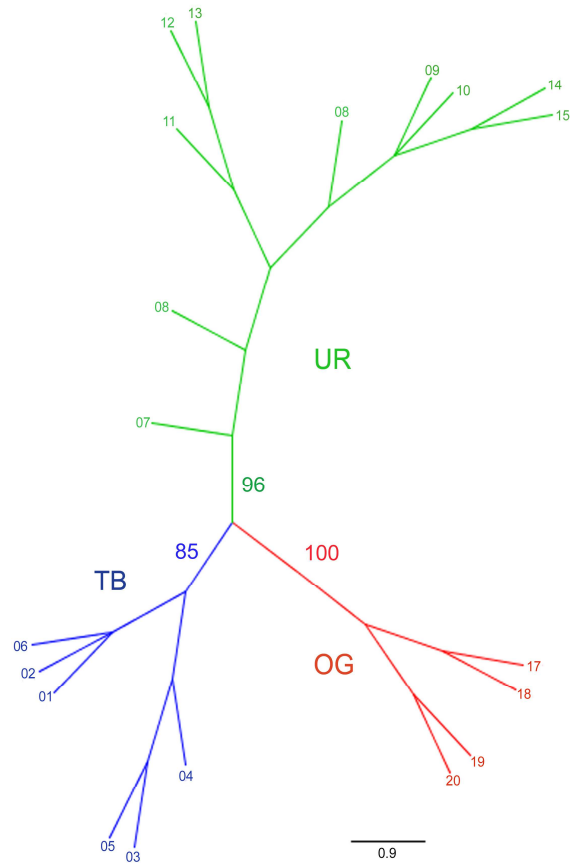
Pop	Uruguai										Tibagi						Grupo externo	
	UR01	UR02	UR03	UR04	UR05	UR06	UR07	UR08	UR09	UR10	TB01	TB02	TB03	TB04	TB05	TB06	Brac	Zung
UR01																		
UR02	0.020																	
UR03	0.018	0.009																
UR04	0.016	0.006	0.005															
UR05	0.020	0.010	0.005	0.006														
UR06	0.020	0.010	0.008	0.006	0.005													
UR07	0.018	0.009	0.008	0.005	0.006	0.006												
UR08	0.018	0.001	0.008	0.005	0.009	0.009	0.008											
UR09	0.025	0.005	0.013	0.012	0.013	0.013	0.014	0.006										
UR10	0.028	0.008	0.016	0.014	0.016	0.016	0.017	0.009	0.011									
TB01	0.032	0.022	0.020	0.016	0.020	0.020	0.021	0.021	0.025	0.028								
TB02	0.039	0.029	0.027	0.023	0.027	0.027	0.028	0.028	0.032	0.035	0.009							
TB03	0.038	0.028	0.022	0.021	0.020	0.022	0.024	0.027	0.031	0.034	0.005	0.012						
TB04	0.036	0.027	0.021	0.020	0.021	0.024	0.025	0.025	0.029	0.032	0.006	0.013	0.009					

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Pop	Uruguai										Tibagi						Grupo externo		
	UR01	UR02	UR03	UR04	UR05	UR06	UR07	UR08	UR09	UR10	TB01	TB02	TB03	TB04	TB05	TB06			
TB05	0.032	0.022	0.017	0.016	0.017	0.020	0.021	0.021	0.025	0.028	0.003	0.009	0.005	0.004					
TB06	0.040	0.031	0.028	0.024	0.022	0.025	0.024	0.029	0.033	0.036	0.010	0.017	0.013	0.014	0.010				
Brac	0.341	0.328	0.321	0.315	0.319	0.321	0.324	0.326	0.333	0.325	0.312	0.311	0.318	0.316	0.309	0.323			
Zung	0.383	0.366	0.356	0.355	0.354	0.362	0.365	0.363	0.372	0.365	0.355	0.355	0.363	0.360	0.353	0.362	0.197		
Soru	0.404	0.381	0.376	0.370	0.376	0.378	0.382	0.378	0.387	0.377	0.369	0.368	0.372	0.380	0.373	0.383	0.242	0.210	

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Figura 4.1 – Árvore obtida com o método de Parcimônia para exemplares de *S. scriptum* dos Rios Tibagi (TB, 1 a 6) e Uruguai (UR, 7 a 16) e grupo externo (OG, *Brachyplatystoma rousseauxii* 17 e 18, *Zungaro zungaro* 19 e *Sorubim lima* 20)



Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Figura 4.2 – Sequenciamento da região D-loop dos grandes bagres (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Sorubim lima*, *Zungaro zungaro*) mostrando a grande quantidade de *gaps* na porção anterior da sequência nos exemplares de *Steindachneridion scriptum*

	5	15	25	35	45	55
0006Urugua	TGAACTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0007Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0056Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0063Urugua	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0075Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0076Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0077Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0078Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
0079Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1261Urugua	TTTTCTGATA	---ATCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1113Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1465Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1466Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1467Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1468Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
1469Tibagi	TTTTCTGATA	---ACCACAT	CCT-----	-----TAA	TGTAC-----	-----TATGG
B. rousseau	TTTTCTGATA	---ACTTCGT	CCITTTCCCAT	GCTATGGTAT	AGTACATAAT	ATGTATATGA
Z. zungaro	TTTTCTGGTA	---ACTTGGT	CCTCT-----	-CTATGGTAT	AGTACATAAT	ATGTATATGA
S. lima	TTTTCTGGTT	TCCACTTTGT	CCCTCT----	-CTATGGTAT	AGTACATAAT	ATGTATATGA

Matoso, D. A.; Cortinhas, M. C. S.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Genetic differentiation on two allopatric populations of *Steindachneridion scriptum*: incipient speciation or geographical variation? (submetido).

Capítulo V

Relações filogenéticas do gênero *Steindachneridion* pela análise de sequências D-Loop do mtDNA

Abstract

Phylogenetic analyses were performed on eight species of big catfishes of Pimelodidae family. The main focus was on four species of *Steindachneridion*. Two phylogenetic approaches were employed (Parsimony and Minimum Evolution). The results displayed similar topologies in all analyses. *Z. zungaro* and *S. lima* form polytomic clade while *B. rousseauxii* clustered closely to *Steindachneridion*. Species of *Steindachneridion* clustered in single groups. However, two bigger clusters were observed between *S. parahybae* + *S. doceanum* and *S. melanodermatum* + *S. scriptum*. A phylogeographic scenario based in geological dynamic of hydrographic basins of eastern Brazilian coastal drainages was proposed.

Key-words: Pimelodidae, big catfishes, evolutionary tendencies

Resumo

Análises filogenéticas foram conduzidas em oito espécies de grandes bagres da família Pimelodidae. Enfoque principal foi dado a quatro espécies de *Steindachneridion*. Foram aplicadas duas abordagens filogenéticas (Máxima Parcimônia e Evolução Mínima) na recuperação das topologias. Os resultados evidenciaram topologias similares para todas as análises realizadas. *Z. zungaro* e *S. lima* formaram um agrupamento politômico e *B. rousseauxii* agrupou mais proximamente de *Steindachneridion*. Todas as espécies de *Steindachneridion* formaram agrupamentos únicos. Mas dois agrupamentos maiores foram observados entre *S. parahybae* + *S. doceanum* e *S. melanoderdatum* + *S. scriptum*. Um cenário filogeográfico baseado na dinâmica geológica das bacias hidrográficas da costa leste brasileira foi proposto.

Palavras-chave: Pimelodidae, grandes bagres, tendências evolutivas.

Introdução

Peixes do gênero *Steindachneridion* são considerados endêmicos às bacias hidrográficas do leste brasileiro. São peixes de couro de difícil captura (GARAVELLO, 2005), e de relativa importância ecológica e econômica (LUDWIG et al., 2005).

De acordo com LUNDBERG et al., (1998), atualmente, 93% dos sistemas fluviais da América do Sul drenam para o Atlântico. Essas drenagens foram moldadas pelos escudos continentais guiano e brasileiro e correspondem a áreas de grande significado biogeográfico, apresentando alto grau de endemismo em sua fauna de peixes (RIBEIRO, 2006). O isolamento desses sistemas de drenagem desde a sua separação da África no Cretáceo a aproximadamente 112 milhões de anos, bem como repetidas incursões e regressões marítimas e mudanças de cursos de rios produziram muitos eventos vicariantes que acabaram determinando padrões de distribuição filogenéticos bem característicos muito relacionados à história geológica da margem continental passiva da América do Sul, esses fenômenos foram por isso também os responsáveis pela divergência alopátrica e a extinção local de espécies peixes amplamente distribuídas (LUNDBERG et al., 1998; RIBEIRO, 2006).

Taxonomicamente o gênero *Steindachneridion* conta com seis espécies viventes revisadas recentemente por GARAVELLO (2005). Evolutivamente é caracterizado por apresentar relações filogenéticas incertas. O grupo surgiu a aproximadamente 13.5 milhões de anos juntamente com outros grupos de pimelodídeos como sua linhagem irmã *Phractocephalus*, o grupo *Calophysus* + *Megalonema*, o grupo *Pimelodus* e os assim chamados sorubimíneos. Fósseis

de *Steindachneridion* da espécie *S. iheringi* foram descritos por WOODWARD (1898) e foram datados da época do Oligoceno (LIMA et al., 1985).

Steindachneridion atualmente é filogeneticamente relacionado ao gênero *Zungaro*. (LUNDBERG et al., 1998), e se encontra inserido num clado conhecido como Sorubiminae composto por uma assembléia onde se incluem os gêneros *Paulicea* (*Zungaro*), *Sorubim*, *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma* entre outros. Apesar de suas relações filogenéticas incertas é considerado monofilético. Apresenta estrutura cariotípica conservada com $2n=56$ cromossomos, sem presença de cromossomos supranumerários, heteromorfismo sexual (SAWARÇA et al., 2006) ou sistema de cromossomos sexuais (MATOSO et al., em preparação).

Buscando acessar as relações filogenéticas do gênero *Steindachneridion* com seus grupos irmãos e entre suas espécies, foi objetivo desse trabalho realizar o sequenciamento de toda a região D-Loop do mtDNA e analisar os padrões filogenéticos encontrados, tentando correlacioná-los com os padrões biogeográficos descritos para sua área de distribuição natural.

Material e Métodos

Nesse estudo foram analisadas 73 sequências de grandes bagres, pertencentes a oito espécies diferentes de Pimelodidae. Foram amostrados 18 exemplares da espécie *S. melanodermatum* do rio Iguaçu (PR), 10 exemplares da espécie *S. scriptum* do rio Uruguai (SC), seis da espécie *S. scriptum* do rio Tibagi (PR), três da espécie *S. parahybae* do rio Paraíba do Sul (SP) e dois da espécie *S. doceanum* do rio Doce (MG). Foram amostrados também um exemplar da espécie *Sorubim lima* e outro da espécie *Zungaro zungaro* ambos

do rio Paraguai (MT). Trinta e uma sequências de *Brachyplatystoma rousseauxii* (BATISTA e ALVES-GOMES, 2006) (números de acesso DQ779016 a DQ779046) e uma sequência de *Brachyplatystoma vaillantii* (número de acesso DQ779047) foram adquiridas do banco de dados do Genbank. Esse conjunto de dados com 73 sequências foi posteriormente subdividido em um segundo conjunto de dados contendo apenas 40 sequências, 39 sequências de *Steindachneridion* e uma de *Zungaro zungaro*.

As análises filogenéticas foram executadas usando as seqüências de *B. rousseauxii*, *B. vaillanti*, *S. lima* e *Z. zungaro* como grupo externo. As sequências obtidas nesse estudo foram depositadas no Genbank sob número de acesso EU930029-EU930047. Os exemplares de *Steindachneridion* foram identificados segundo os critérios propostos por GARAVELLO (2005) e depositados no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Amostras de músculo e nadadeira foram coletadas e usadas para a extração de DNA seguindo as metodologias descritas por SAMBROOK et al. (1989) ou MURRAY e THOMPSON (1980).

A região D-loop inteira foi sequenciada usando 5 ng de DNA, 1.5 mM MgCl₂, solução tampão 1x, 200 µM de cada dNTP, 0.5 U de DNA *Taq* polimerase e 0.5 µM de cada primer (FTTF: 5'CAA AGC GCC GGT CTT 3' e F12R 5'GTC AGG ACC ATG CCT TTG3') (SIVASUNDAR et al., 2001).

A PCR foi inicialmente realizada em cinco ciclos, com desnaturação de um minuto a 94°C, hibridização a 53°C por um minuto e alongação a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido por 25 ciclos a 50°C para o passo de hibridização. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de

agarose 0.8% usando o fago λ como marcador de massa molecular. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador modelo PTC-100 da MJ Research.

As amostras foram purificadas com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE HealthCare) e sequenciadas com o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE HealthCare) seguindo as instruções do fabricante. Todos os DNAs moldes (templates) foram sequenciados em ambas as direções em um sequenciador MEGABACE (GE HealthCare). As imagens foram documentadas pelo sistema de análise e documentação de eletroforese da Kodak (EDAS) 290.

As comparações par a par e o alinhamento das sequências foram realizados com o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Os parâmetros usados nos alinhamentos foram de 6.66 e 10.0 para abertura e extensão de *gaps* nos alinhamentos par a par e de 10.0 e 15.0 para os alinhamentos múltiplos para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente. As informações estatísticas e as análises filogenéticas foram conduzidas pelo uso do programa PAUP v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). As inferências filogenéticas foram executadas com abordagens de Parcimônia (Parsimony – P) (FITCH, 1977), Evolução Mínima (Minimum Evolution – ME) (RZHETSKY e NEI, 1992) com algoritmo fenético de Agrupamento de Vizinhos (Neighbor Joining - NJ) (SAITOU e NEI, 1987).

O programa MODELTEST 3.7 (POSADA e CRANDALL, 1998) foi usado para determinar o modelo ótimo de evolução nucleotídica. Dois conjuntos de dados foram utilizados nas análises, um com a presença de todas as 73

sequências e outro com apenas as sequências de *Steindachneridion* mais uma sequência de *Zungaro zungaro* usada como grupo externo.

Para a análise ME do primeiro conjunto de dados (n=73) o modelo evolutivo escolhido foi o de Hasegawa-Kishino-Yano 85 corrigido pela distribuição gamma (HKY85+Gamma) (RODRIGUEZ et al., 1990). Para o segundo conjunto de dados (n=40) o modeltest selecionou HKY+G como melhor modelo evolutivo pela estimativa hLRT e GTR+G pela estimativa AIC. Para verificar que topologia seria fornecida para esse segundo conjunto de dados usando um modelo evolutivo mais complexo, o modelo GTR+G foi selecionado. Buscas heurísticas foram conduzidas pelo método de adição de táxon stepwise com 10.000 replicações, combinadas com o método TBR (tree-bisection-reconnection) como algoritmo de troca de braços (ramos) da árvore. Análises *Bootstrap* com 10.000 replicações foram executadas para acessar a robustez dos ramos e a confiança da topologia obtida.

Resultados

Para o conjunto total de dados (n=73), as sequências alinhadas totalizaram 927bp de comprimento, dos quais 355bp foram constantes, 161bp não foram informativos para parcimônia e 411bp foram informativos. O parâmetro alfa foi igual 1.051 e a frequência de bases foi de A=0.31740 C=0.21810 G=0.13160 T=0.33290. A proporção de transições sobre transversões (Ts/Tv) foi igual a 1.3711.

Para o segundo conjunto de dados (n=40), as sequências alinhadas totalizaram 896bp com 449bp constantes, 189 sítios não informativos e 258 informativos para parcimônia. O parâmetro alfa foi igual 1.1168 e a frequência

de bases foi de A=0.31740 C=0.21810 G=0.13160 T=0.33290. A pontuação da árvore mais parcimoniosa foi de 704 passos.

A divergência genética obtida para o segundo conjunto de dados variou de 0.003 (0,3%) a 0.344 (34%).

Todas as topologias obtidas foram similares. Na topologia construída com as 73 sequências, *Z. zungaro* e *S. lima* formaram uma politomia. *B. vaillantii* agrupou numa posição mais basal à *B. rousseauxii* e ao restante do grupo. *B. rousseauxii* formou um agrupamento mais próximo e consistente com *Steindachneridion*. No grupo *Steindachneridion*, *S. parahybae* formou um agrupamento com *S. docenum*. *S. melanodermatum* formou um agrupamento único, porém mais próximo à *S. scriptum*. Para a topologia recuperada com o segundo conjunto de dados contendo 39 sequências de *Steindachneridion* mais uma sequência de *Z. zungaro*, foram mantidos os agrupamentos formados pelo conjunto total de dados independentemente do método ou do modelo evolutivo utilizado na análise (Figuras 5.1 e 5.2).

Foi observado um elevado número de *gaps* nas sequências de *Steindachneridion* em relação ao grupo externo e essa alteração de tamanho da foi a característica mais marcante entre as sequências aqui analisadas.

Discussão

De acordo com PINNA (1998) o grupo formado pelos Sorubimíneos composto por *Sorubim*, *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma* dentre outros gêneros, não demonstra ser um grupo monofilético e a politomia resultante de sua análise cladística é a maior existente entre os pimelodídeos. Inserido nesse contexto o gênero *Steindachneridion* está colocado como proximamente

relacionado ao gênero *Zungaro* (LUNDBERG et al., 1998), e embora a monofilia da família Pimelodidae tenha sido muito discutida, a monofilia de *Steindachneridion* tem sido corroborada com estudos recentes (GARAVELLO, 2005). Entretanto, o acesso da diversidade dentro do gênero, bem como o exame adequado de suas relações filogenéticas com outros pimelodídeos tem sido prejudicado principalmente pela escassez natural do gênero e dificuldades de coleta (PINNA, 1998; LUNDBERG e LITTMANN, 2003; LUNDBERG e AKAMA, 2005; GARAVELLO, 2005).

Num trabalho realizado com marcadores morfológicos PINNA (1998) encontrou 15 sinapomorfias que foram combinadas com outros dados para montar uma topologia onde se observou uma politomia entre *Platynemichthys*, *Brachyplatystoma* + *Goslinea*, *Piramutana*, *Merodontotus* e *Steindachneridion*, com relações melhor resolvidas entre *Hemisorubim* + *Zungaro*, *Sorubim*, *Pseudoplatystoma* + *Sorubimichthys*. De acordo com esse resultado *Zungaro* é grupo irmão de *Hemisorubim* e *Steindachneridion* apresenta uma topologia colapsada com demais gêneros de grandes bagres.

No presente estudo as relações de *Steindachneridion* são mais bem delineadas. De acordo com os nossos resultados *Steindachneridion* está mais proximamente relacionado ao gênero *Brachyplatystoma*, mais especificamente a *B. rousseauxi*, o que corrobora o dado obtido por PINNA (1998). Entretanto, esse agrupamento pode ser artificial já que *Brachyplatystoma* é considerado pelo mesmo autor, como um grupo não monofilético e apenas outros dois gêneros foram representados no atual conjunto de dados, com uma sequência cada. Apesar disso os agrupamentos internos obtidos para as quatro espécies

de *Steindachneridion* investigadas, são bastante conclusivos e podem ser explicados por padrões biogeográficos.

Segundo RIBEIRO (2006) e LUNDBERG et al. (1998), os sistemas fluviais da América do Sul, e o padrão de drenagens da costa leste foram moldados pelos escudos continentais guiano e brasileiro. Soerguimentos macrodômicos, rifteamentos, movimentos verticais entre os blocos falhados e o recuo erosivo da margem leste foram as forças geológicas que mais atuaram na distribuição da ictiofauna de água doce nessas áreas.

Baseados no padrão biogeográfico proposto por RIBEIRO (2006) é factível a inclusão do gênero *Steindachneridion* na classe B de distribuição atribuída pelo autor. Nesse padrão estão incluídos os táxons com distribuição endêmica pelas drenagens costeiras, mas que mantém relações filogenéticas com a ictiofauna dos escudos adjacentes com graus intermediários de inclusão e resolução ao nível filogenético de gênero. *Steindachneridion* pode ser incluído nessa classe porque possui distribuição endêmica nas bacias costeiras para três de suas seis espécies, mantendo uma distribuição mais ampla pelas bacias do Alto Paraná, incluindo o rio Iguazu e Rio Uruguai. Além disso, *Steindachneridion* mantém relações de parentesco com *Zungaro*, *Sorubim* e *Pseudoplatystoma*, táxons de distribuição mais ampla e está proximamente relacionado ao gênero *Brachyplatystoma* presente na bacia Amazônica.

Ainda baseados nas características biogeográficas da costa leste brasileira, uma possível explicação para os agrupamentos observados entre as espécies *S. doceanum* + *S. parahybae* e *S. melanodermatum* + *S. scriptum* pode estar relacionada à proximidade geográfica das cabeceiras dos rios onde ocorrem. DERGAM et al. (2002) ao sequenciarem o gene 16S de *Hoplias*

malabaricus encontraram uma complexa inter-relação entre as Bacias dos rios Doce, Paraíba do Sul e Grande devido ao compartilhamento de vertentes que foram separadas no Plio-Pleistoceno. Segundo RIBEIRO (2006), sucessivos eventos de capturas de cabeceiras experimentados pelas bacias hidrográficas como consequência do recuo erosivo da margem passiva podem ter determinado as relações entre as espécies de peixes que as habitavam e atualmente a ictiofauna dessas bacias é reflexo de uma fauna relictual que ainda guarda semelhanças entre si. (TORRES et al., 2007; MENEZES et al., 2008)

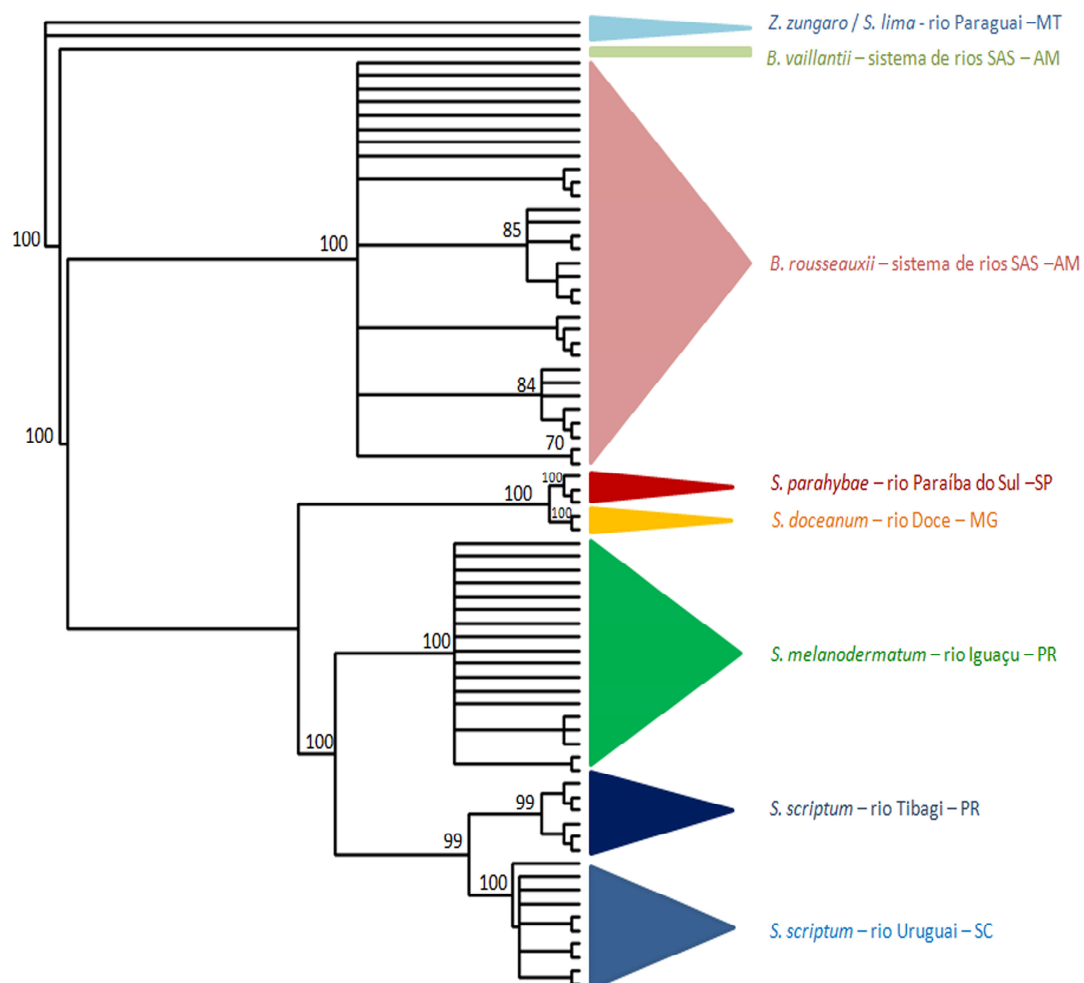
O gênero *Steindachneridion* está incluído na Lista Nacional de Vertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção (Ministério do Meio Ambiente, 2004) e as espécies *S. punctatum* ocorrente na bacia do Alto rio Paraná e *S. amblyurum* natural da bacia do rio Jequitinhonha não foram amostradas com os esforços de coleta disponibilizados no presente estudo, demonstrando a dificuldade em capturar essas espécies e evidenciando seu elevado risco de extinção. Embora muitas lacunas ainda estejam abertas quanto às relações filogenéticas do gênero *Steindachneridion* o presente trabalho é uma tentativa de suprir a falta de informação concernente a esse aspecto da dinâmica evolutiva desse grupo de peixes. De acordo com PINNA (1998) como a diversificação dos Siluriformes, na região Neotropical, precedeu a separação entre a América do Sul e outros blocos continentais, para a elaboração de um cenário filogenético e biogeográfico mais conclusivo é necessária a inclusão de informação comparativa com táxons não-neotropicais. Por isso investigações futuras sobre a sistemática de Sorubiminae ajudarão a esclarecer as relações filogenéticas das linhagens basais que compõem esse

grupo e abordagens filogenéticas baseadas em maior número de táxons e de padrão de distribuição similar àquele verificado para *Steindachneridion* podem prover suporte adicional a algumas das conclusões aqui apresentadas.

Referências

As referências citadas neste capítulo se encontram apresentadas juntamente com as demais referências citadas nesta tese no item **Referências Bibliográficas**.

Figura 5.1 – Árvore filogenética obtida pelo método de parcimônia e evolução mínima para oito espécies de grandes bagres. Valores de suporte da análise *bootstrap* para 10.000 replicações, são mostrados acima de cada ramo.



Capítulo VI

Isolamento de DNAs repetitivos por microdissecção cromossômica/DOP-PCR, digestão enzimática por *AluI* e *Cot-1*: investigando a origem dos cromossomos polimórficos 9 e 14 em *S. melanodermatum*

Abstract

Searching the origin of length differences between polymorphic submetacentric chromosomes 9 and 14 on *S. melanodermatum*, were applied three different methods to the isolation repetitive DNA sequences. The results displayed positive signals for two probes that stained different regions of genome. The probe isolated by microdissection/DOP-PCR hybridized in terminal portions of all chromosomes and the probe obtained by *Cot-1* methodology displayed positive signals in the centromeric and 18S⁺/AgRON⁺ of chromosomes. These results showed the occurrence of different kinds of repetitive DNA sequences in *S. melanodermatum* genome.

Key-words:satellite DNAs, FISH, probes

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

Resumo

Buscando esclarecer a origem da diferença de tamanho dos cromossomos polimórficos submetacêntricos 9 e 14 na espécie *S. melanodermatum*, foram aplicadas três diferentes metodologias para o isolamento de sequências de DNAs repetitivas. Os resultados evidenciaram sinais positivos para duas sondas que hibridizaram em diferentes regiões do genoma. A sonda obtida por microdissecção/DOP-PCR hibridizou nas porções terminais de todos os cromossomos do complemento e a sonda obtida por *Cot*-1 hibridizou nas regiões centroméricas e nas regiões 18S⁺/AgRON⁺ dos cromossomos. Esses resultados evidenciaram a ocorrência de diferentes tipos de sequências de DNAs satélites no genoma de *S. melanodermatum*.

Palavras-chave: DNAs satélites, FISH, sondas

Introdução

As análises citogenéticas têm mostrado que diversas características dos cromossomos de peixes, tais como regiões organizadoras de nucléolos, sequências satélites e teloméricas são similares (OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto como essas regiões são constituídas por sequências de DNA altamente repetitivo elas podem apresentar composição variável (SUMNER; 2003).

Frequentemente o bandamento C tem sido usado para detectar regiões heterocromáticas nos cromossomos de vertebrados, mas essa técnica não provê informação quanto à composição dessa heterocromatina e por isso fluorocromos base-específicos são úteis para caracterizar domínios AT ou GC ricos. Fato reconhecido é que os cromossomos de *S. melanodermatum* assim como das demais espécies de grandes bagres citogeneticamente estudadas apresentam poucas regiões heterocromáticas (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992; MARTINS-SANTOS et al., 1996; SWARÇA et al., 2001; SWARÇA et al. 2003; SWARÇA et al., 2005).

De acordo com a literatura um padrão distinto e reproduzível de bandas eucromáticas é difícil de ser obtido em cromossomos de peixes, característica que se deve principalmente a diferenças de componentes estruturais relacionados à ausência de isocóres no genoma desses vertebrados (OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto, bandas longitudinais na eucromatina de cromossomos de peixes têm sido obtidas (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1988; GOLD et al., 1990, BERTOLLO et al., 1997, SWARÇA et al., 2006), mas a

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

resolução dessas bandas não é tão bem definida quanto aquela observada no genoma de vertebrados de sangue quente (OLIVEIRA et al., 2002).

SWARÇA et al. (2006), obtiveram por digestão enzimática com *EcoRI* em *S. melanoderdatum* (citado como *Steindachneridion* sp.), um padrão similar ao padrão de bandamento G e aplicando outros bandamentos sugeriram a ocorrência de diferentes classes de sequências de DNA repetitivos presentes no genoma dessa espécie. Nesse mesmo trabalho foi realizada a primeira descrição do cariótipo de *S. melanoderdatum* com $2n=56$ cromossomos em ambos os sexos e fórmulas cariotípicas diferentes. De acordo com os autores *S. melanoderdatum* apresenta um sistema cromossômico sexual tipo XY, com o cromossomo Y sendo maior que o X, não heterocromático, originado de uma amplificação de sequência SINE similar a *Alu*. Mais recentemente MATOSO et al. (em preparação) encontraram um polimorfismo envolvendo esses cromossomos, caracterizando-os como submetacêntricos 9 e 14 presentes em ambos os sexos.

O presente trabalho teve por objetivo aplicar técnicas de isolamento de sequências de DNA repetitivas no genoma de *S. melanoderdatum* na tentativa de elucidar a natureza da amplificação verificada no cromossomo polimórfico submetacêntrico número 9 dessa espécie.

Material e Métodos

Para obtenção das sondas cromossômicas por microdissecção, foram utilizados capilares de borossilicato de 1 milímetro de diâmetro aquecidos para

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanoderdatum* (em preparação).

formar a agulha de microdissecção. Foram microdissectados sete cromossomos acrocêntricos de uma única metáfase. Os sete cromossomos foram usados como DNA molde para as PCRs com oligonucleotídeos degenerados. A DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR) foi realizada com uma combinação do oligonucleotídeo 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3', (TELENIUS et al., 1992). A primeira PCR foi realizada em um tubo de 0,2 ml contendo 15,5 µl de água ultra pura, 2 µl de tampão de reação da Termosequenase (10X), 4 µl de dNTP (2,5 mM cada) e 2,5 µl de Termosequenase (4U/ µl). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient, da Eppendorf. Os produtos da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio 1% (10mg/ml) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta. A segunda PCR foi realizada para a obtenção de maior número de cópias das sondas contendo 35,5 µl de água ultra pura, 5 µl de tampão de reação da *Taq* polimerase (10X), 4 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de *primer* (100 pM), 0,5 de *Taq* polymerase (5U/ µl), 1 µl do produto da primeira PCR, num volume final de 50 µl. Com o produto da segunda PCR foi realizada uma terceira PCR, contendo 32,5 µl de água ultra pura, 5 µl de tampão de reação da *Taq* polymerase (10X), 4 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de *primer* (100 pM), 0,5 µl da enzima *Taq* polymerase (5U/µl), 1 µl do produto da 2ª PCR, totalizando um volume final de 50 µl. As PCRs foram executadas com as seguintes condições de temperatura: 30 ciclos a 90°C por 3 minutos, 90°C por 1 minuto e 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 30 segundos,

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

72°C por 1 minuto e 30 segundos. O produto do último PCR foi submetido a uma corrida em gel de agarose 0.8% para a verificação do tamanho dos fragmentos obtidos. A marcação das sete sondas foi realizada por *Nick translation* com 10 µl de DNA (sonda), 6 µl de água ultra pura, 4 µl de mix de digoxigenina e 4 µl de mix de biotina, deixada 1 hora e 30 minutos a 15°C e aquecida a 65°C por 10 minutos, seguida de precipitação com 2 µl de acetato de sódio 3M, 50 µl de etanol 100% e deixada *overnight* no congelador. As sondas foram posteriormente lavadas em etanol 70% e ressuspensas em 20 µl de água ultra pura. A dupla FISH foi realizada de acordo com PINKEL et al. (1980). Para a obtenção de outras sondas de DNA repetitivos de *S. melanoderdatum* foram utilizadas as técnicas de *Cot-1* DNA descrita por ZWICK et al. (1997) que está baseada na cinética de reassociação do DNA e digestão enzimática por *AluI*. Para a obtenção da sonda do SINE *Alu*, o equivalente a 3 µg de DNA genômico total de *S. melanoderdatum* foi digerido com *AluI* (1U/µl), seguindo as instruções do fabricante. As sondas com sinais positivos de hibridização tiveram o produto de PCR purificados e clonados no plasmídeo vetor pTZS7R/T (Fermentas) para serem posteriormente sequenciadas.

Resultados e Discussão

Três sondas de DNA repetitivos de *S. melanoderdatum* foram isoladas (Figura 6.1). A sonda obtida por digestão com a enzima *AluI* não demonstrou, pela FISH, sinais de hibridização no genoma de *S. melanoderdatum*. Entretanto as outras duas sondas isoladas por microdissecção/DOP-PCR e

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanoderdatum* (em preparação).

Cot-1 mostraram sinais de hibridização em diferentes locais nos cromossomos dessa espécie. A sonda obtida por microdissecção/DOP-PCR hibridizou nas regiões terminais de praticamente todos os cromossomos do complemento (Figura 6.2b). A sonda obtida pela metodologia de *Cot-1* hibridizou nas porções centroméricas de alguns cromossomos e na região coincidente com 18S⁺ e AgRON⁺ (Figura 6.2d). De acordo com esses resultados é possível que as regiões onde as sondas hibridizaram sejam constituídas por porções de DNA repetitivo de composições diferentes, uma hipótese levantada por SWARÇA et al. (2006) e corroborada nesse estudo.

VICARI et al. (2008) analisando sequências repetitivas de *Astyanax janiroensis* conseguiram identificar pelo menos três classes de DNA repetitivos relacionados à heterocromatina: 1- heterocromatina centromérica/telomérica, visualizada na maioria dos cromossomos; 2- heterocromatina 18S⁺/GC⁺ associada a diversos sítios de RON e 3- heterocromatina As51⁺/18S⁺/DAPI atenuada, colocalizada nas regiões intersticiais e teloméricas do par 14. Em teleósteos, os sítios de rDNA 18S sempre compreendem grandes frações de DNA GC rico (SCHMID e GUTTENBACH, 1998; MANTOVANI et al., 2004), indicando que os genes ribossomais são intercalados com heterocromatina GC rica (PENDÁS et al., 1993). Embora a natureza composicional das regiões de DNAs satélites verificadas no presente estudo não tenham sido elucidadas, pode-se inferir que a região identificada pela sonda obtida por *Cot-1*, possivelmente é GC rica, já

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

que hibridizou nas regiões 18S⁺/AgRON⁺, mas também nas regiões centroméricas de *S. melanodermatum* (Figura 6.2d).

Em vertebrados o genoma possui entre 2 e 10% de sequências de cópia simples (OLIVEIRA et al., 2002) sendo o restante composto por sequências repetitivas como os elementos transponíveis, retrotransposons ou transposons (CHARLESWORTH et al., 1994). Esses componentes genéticos são potencialmente mutagênicos e capazes de produzir grande variação no genoma hospedeiro (KIDWELL e LISH, 2001). Alguns estudos têm demonstrado que as regiões de DNAs satélites podem estar dispersas por todo o genoma de uma espécie, o que sugere um intenso movimento desses elementos entre os cromossomos não homólogos com distribuição e homogeneização dessas unidades repetitivas pelo genoma (HAMILTON et al., 1994; HAMILTON et al., 1992).

OLIVEIRA e WRIGHT (1998) combinando as técnicas da bandamento C, digestão cromossômica e hibridização fluorescente *in situ* com duas sondas de DNAs satélites, identificaram a natureza composicional das bandas C de *Oreochromis niloticus* como sendo compostas principalmente pelos DNAs satélites SATA e SATB, posteriormente OLIVEIRA et al. (1999) identificaram a composição da sequência heterocromática do braço longo do par 1 que não hibridizou com sequências SATA e SATB como sendo um elemento retrotransposon da classe LINE denominado para ciclídeos como CiLINE.

Embora os estudos sobre a distribuição de seqüências SINE e LINE nos cromossomos de peixes estejam somente iniciando, os resultados sugerem

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

que estes elementos podem estar relacionados à ausência de padrão de bandamentos nos cromossomos desses vertebrados (OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002) e os arranjos mutacionais induzidos por estes elementos são agentes causais na origem da variação genética em nível molecular (KIDWELL e LISCH, 2001), promovendo inclusive o silenciamento gênico (FANTI et al., 1998; VICARI et al., 2008) quando da sua inclusão em regiões eucromáticas (HOLMQUIST e ASHLEY, 2006).

Os resultados aqui apresentados embora preliminares refletem algumas tendências evolutivas experimentadas pela espécie *S. melanodermatum*, como verificado pelo acúmulo de elementos repetitivos de composição diferencial nas sequências 18S⁺/AgRON⁺ e regiões terminais dos seus cromossomos.

Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanodermatum* (em preparação).

Figura 6.1 – (a) Digestão enzimática por *AluI* do DNA total de *S. melanoderdatum* mostrando o padrão em escada do DNA digerido, (b) DNA total autoclavado, (c) DNA tratado com a enzima S1 nuclease após autoclave.

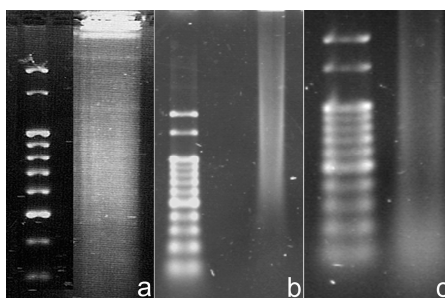
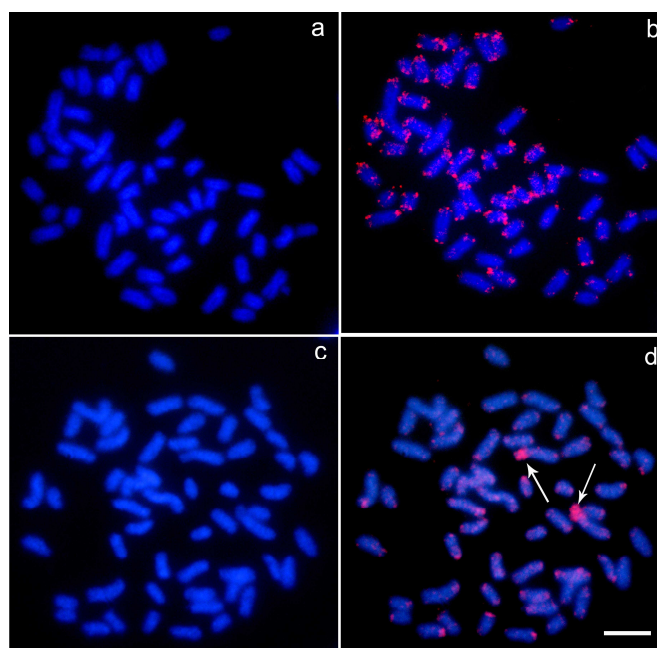


Figura 6.2 – (a) Coloração por DAPI e (b) sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por microdissecção mostrando as regiões terminais marcadas. (c) Coloração por DAPI e (d) sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por *Cot-1*, mostrando as regiões centroméricas e de 18S⁺/AgRON⁺ marcadas (setas).



Silva, M.; Matoso, D. A.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F. Isolation of repetitive DNAs by microdissection/DOP-PCR, enzymatic digestion by *AluI* and *Cot-1* - searching the origin of 9 and 14 chromosomes on *S. melanoderdatum* (em preparação).

Conclusões

No presente trabalho foram usadas diversas ferramentas da citogenética clássica e molecular, bem como marcadores moleculares RAPD e sequenciamento da região controle de seis espécies de grandes bagres da família Pimelodidae, com a intenção de: averiguar a hipótese de ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais XX/XY em *S. melanodermatum*, analisar o nível de heterozigose em exemplares cultivados e selvagens dessa espécie, acessar a divergência genética existente entre as quatro espécies de *Steindachneridion* analisadas e outras quatro espécies de grandes bagres, estabelecer relações de parentesco entre essas espécies e reconhecer padrões e processos evolutivos no gênero *Steindachneridion*. Baseada nessas considerações, a seguir são sumarizadas as principais conclusões desse trabalho.

1 – *Steindachneridion melanodermatum* apresenta um polimorfismo envolvendo os cromossomos submetacêntricos 9 e 14 do complemento. O cromossomo 9 é de tamanho maior que o cromossomo 14, e sua origem até o presente momento não foi elucidada. No entanto foi proposta como sendo o produto da amplificação de um elemento SINE da família *Alu*;

2 – A análise de células meióticas em ambos os sexos não forneceu indícios da existência de qualquer tipo de sistema cromossômico sexual na espécie *S. melanodermatum*;

3 – *S. melanodermatum* apresenta um segundo polimorfismo de natureza comum a outros pimelodídeos envolvendo um heteromorfismo de tamanho das regiões organizadoras de nucléolo;

4 – *S. melanodermatum* possui estoques selvagens geneticamente diferenciados vivendo em simpatria na natureza, pois pela análise de similaridade genética espécimes desse estoque agruparam em clados separados;

5 – A heterozigose no estoque analisado não se encontra geneticamente ameaçada, pelo menos em relação à geração F1;

6 – Sequências da região D-Loop foram suficientemente resolutivas para apontar os contrastes filogenéticos entre as espécies de *Steindachneridion* e demais espécies analisadas;

7 – *S. scriptum* do rio Tibagi e *S. scriptum* do rio Uruguai podem ser considerados um mesmo clado, mas estão em processo incipiente de diversificação genética por alopatria;

8 – *Steindachneridion* possui relação filogenética mais próxima de *Brachyplatystoma* um grande bagre amazônico;

9 – Um panorama biogeográfico baseado no padrão de drenagem da costa leste brasileira, na dinâmica dos processos geológicos que deram origem a margem passiva sul-americana e eventos vicariantes com divergência alopátrica fornecem um cenário evolutivo capaz de explicar a atual distribuição do gênero *Steindachneridion* pelas bacias hidrográficas do Atlântico leste e as relações internas entre suas espécies.

10 – Sequências de DNA repetitivo de composições diferenciadas estão sendo acumuladas pelo genoma de *S. melanodermatum* e podem estar

desempenhando um papel relevante nos processos evolutivos experimentados pela espécie.

11 – A variabilidade genética nas populações de *Steindachneridion* parece estar em níveis perigosos para a manutenção destas em seus *habitats* naturais por isso medidas de restauração dessa variabilidade seriam úteis para a conservação dessas espécies.

12 – Os dados aqui apresentados são de fundamental relevância para a genética da conservação animal especificamente para as espécies do gênero *Steindachneridion*, um grande bagre endêmico das bacias hidrográficas brasileiras em risco de extinção.

Referências Bibliográficas

- Aggarwal, R., Sharma, V., Kharbikar e Renu, L. L. (2008). Molecular characterization of *Chatomium* species using URP-PCR. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 4, 943 – 946.
- Agostinho, A. A., Julio Jr., H. F. e Borghetti, J. R. (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. *Revista Unimar*, 14, 89 – 107.
- Agostinho, A. A., Júlio Jr., H. F., Gomes, L. C., Bini, L. M., Agostinho, C. S. (1997). Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazoller, A. E. A. de M., Agostinho, A. A., Hahn, N. S. ed. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM, 179-208.
- Ali, B. A., Huang, T-H, Qin, D-N. e Wang, X-M. (2004). A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14, 443 – 453.
- Almeida, F. S. e Sodré, L. M. K. (1998). Analysis of genetic variability in three species of Pimelodidae (Ostariophysi – Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 21, 4, 487 – 492.
- Almeida, S. F., Sodr , L. M. K. e Contel, E. P. B. (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from Tiet  and Paranapanema rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 26, 3, 301 – 305.
- Almeida-Toledo, L. F., Forestil, F. e Trajano, E. (1992). Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella korney* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia*, 45, 255 – 262.
- Alves-Gomes, J., Ort , G., Haygood, M., Heiligenberg, W. E. e Meyr, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their eletrogenoc system: a synthesis based on morphology, electrophysiology and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*. 12, 2, 298 – 318.
- Artoni, R. F. e Almeida, M. C. A (2002). Singular diversidade dos peixes dos Campos Gerais: uma visão genética para abordagem conservacionista da região. In: Ditzel, C. H. M. e Sahr, C. L. L. eds. Espaço e cultura: Ponta Grossa e os Campos Gerais. Ponta Grossa, Brasil: Imprensa Universitária da UEPG, 505 – 518.

- Artoni, R. F. e Bertollo, L. A. C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134, 201 – 210.
- Batista, J. S. e Alves-Gomes, J. A. (2006). Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, 5, 723 – 740.
- Bertollo, L. A. C., Takahashi, C. S. e Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal Genetics*, 1, 103 – 120,
- Bertollo L. A. C., Takahashi, C. S. e Moreira-Filho, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal Genetics*, 2, 17 – 37.
- Bertollo, L. A. C., Fontes, M. S., Fenocchio, A. S. e Jesus, C. (1997). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, 5, 493 – 499.
- Bertollo, L. A. C. e Mestriner, C. A. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome Research*, 6, 141 – 147.
- Boore, J. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27, 8, 1767 – 1780.
- Black IV, W. C. (1998). Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi and Paraná Rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21, 4, 493 – 496.
- Borin, L. A. e Martins-Santos, I. C. (2004). Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçú. *Hereditas*, 140, 201 – 209.
- Brahmane, M. P., Mitra, K. e Mishra, S. S. (2008). RAPD fingerprinting of the ornamental fish *Badis badis* (Hamilton 1822) and *Dario Dario* (Kullander and Britz 2002) (Perciformes, Badidae) from West Bengal, India. *Genetics and Molecular Research*, 31, 3, 789 – 792.
- Brum, M. J. I., Galetti Jr, P. M., Correa, M. M. O. e Aguilar, C. T. (1992). Multiple sex chromosomes in South Atlantic ash, *Brevoortia aurea*, Clupeidae. *Brazilian Journal Genetics*, 15, 547 – 553.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S. A. e DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 135 – 153.

- Campos, J. L. (2005). O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* Brasil. Baldisserotto, B. e Gomes, L. de C. org. UFSM, Santa Maria,
- Capistano, T. G., Castro, A. L. B. P. e Júlio-Junior, H. F. (2008). Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (supl.), 203 – 207.
- Carvalho, R. A., Giuliano-Caetano, L. e Dias, A. L. (2004). Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi River, Paraná, Brazil. *Cytologia*, 69, 381 – 385.
- Carvalho, R. A. e Dias, A. L. (2005). Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics and Molecular Research*, 4, 663 – 667.
- Centofante, L., Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 55, 139 – 150.
- Chalesworth, B., Sniegowski, P. e Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eucaryotes. *Nature*, 371, 215 – 220.
- Chan, B. K. K., Tsang, L. M. & Chu, K. H. (2007). Morphological and genetic differentiation of the acorn barnacle *Tetraclita squamosa* (Crustacea, Cirripedia) in East Asia and description of a new species of *Tetraclita*. *Zoologica scripta*, 36, 79 – 91.
- Coelho, A. S. G. (2004). Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Laboratório de Genética e Genômica de Plantas – DBG/ICB/UFG, 29.
- Dergam, J. A., Suzuki, H. I., Shibatta, O. A., Duboc, L. F., Júlio Jr., H. F., Giuliano-Caetano, L. e Black IV, W. C. (1998). Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21, 4, 493 – 496.
- Dergam, J. A., Paiva, S. R., Schaeffer, C. E., Godinho, A. L. e Vieira, F. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 4, 379 – 387.
- Dias, A. L. e F. Foresti. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Revista Brasileira de Genética*, 16, 585 – 600.
- Faber, J. E. e Stepien, C. A. (1997). The Utility of Mitochondrial DNA Control Region Sequences for Analyzing Phylogenetic Relationships among Populations, Species, and

- Genera of the Percidae. In: Kocher, T. D.; Stepien, C. A. *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, p. 129 - 143
- Fanti L, Dorer D. R., Berloco, M., Henikoff, S. e Pimpinelli, S. (1998). Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays. *Chromosoma*, 107, 286 – 292.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal Molecular and Evolution*, 17, 368 – 376.
- Fenocchio, A. S., Venere, P. C., Cesar, A. C. G., Dias, A. L. e Bertollo, L. A. C. (1991). Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*, 44, 161 – 166.
- Fenocchio, A. S. e Bertollo, L. A. C. (1992). Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios*, 69, 41 – 46.
- Ferraris Jr., C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418, 1 – 628.
- Figueiredo, F. J. e Costa-Carvalho, B. C. M. (1999). *Steindachneriodion silvantosi* n. sp. (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) from the Tertiary of Taubaté Basin, São Paulo, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71, 683 – 695.
- Fitch, W. M. (1977). On the Problem of Discovering the Most Parsimonious Tree. *The American Naturalist*, 978, 223 – 257.
- Foresti, F., Oliveira, F, Galetti Jr., P. M. e Almeida-Toledo, L. F. (1993). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36, 1124 – 1128.
- Galetti Jr., P. M., Foresti, F., Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (1981) Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenetic Cell Genetics*, 29, 138 - 142.
- Garavello, J. C. (2005). Revision of genus *Steindachneriodion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 3, 4, 607 - 623.
- Garcia, C. e Moreira-Filho, O. (2005). Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology*, 3, 2, 285 – 290.
- Garcia, C. e Moreira-Filho, O. (2008). Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular Biology*, 31, supl. 261 – 264.

- Giuliano-Caetano, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em Populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricaridae). São Carlos (SP), 1998. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
- Gold, J. R., Li, Y. C., Shipley, N. S., Powers, P. K. (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37, 563 – 575.
- Gosline, W. A. (1945). Catálogo dos nematognatos de água doce da América do Sul e Central. *Boletins do Museu Nacional Série Zoológica*, 33, 1 – 138.
- Greenwood, P., Humphry, D., Rosen, E., Weitzman S. H, e Myers, G. S. (1966). Phyletic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. Volume 131 Article 4, New York.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95 - 98.
- Hamilton, M. J., Honeycutt, R. L. e Baker, R. J. (1990). Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from *in situ* hybridization. *Chromosome* 99, 321 - 329.
- Hamilton, M. J., Hong, G. e Wichman, H. A. (1992). Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from *in situ* hybridization. *Cytogenetic Cell Genetics*, 60, 41 - 44.
- Hasegawa, M., Yano, T. e Kishino, H. (1984). A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of hominoids. *Proceedings of the Japanese Academy*, B60, 95 - 98.
- Hasegawa, M., Yano, T. e Kishino, H. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clocks of mitochondrial DNA. *Journal Molecular and Evolution*, 32, 443 - 445.
- Hatanka, T. e Galetti Jr. P. M. (2003). RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 1, 19 - 25.
- Hatanaka T. e Galetti Jr., P. M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122, 239 – 244.
- Hilsdorf, A. W. e Petreire Jr., M. P. (2002). Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*, 30, 180, 62 – 65.

- Holmquist, G. P. e Ashley, T. (2006). Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, 114, 96 – 125.
- Howell, W. M. e Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014 – 1015.
- Hsu, T. C., Spirito, S. C. e Pardue, M. L. (1975). Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25 - 33.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. e Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310 – 2314.
- Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et des jura. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 37, 547 – 579.
- Kidwell, M. G. e Lisch, D. R. (2000). Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* 15: 95 – 99.
- Kligerman A. D. e Blomm, S. E (1977). Rapid chromosome preparations from solid tissues of Fishes. *J Fish Res Bd Can* ,34, 266 - 269.
- Kumar, S., Tamura, K. e Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150 - 163.
- Ribeiro, L. B., Matoso, D. A., Almeida M. C., Vicari, M. R., Moraes-Neto, A., Svidnicki, M. C. C. M. e Artoni, R. F. (2008). Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Genetics and Molecular Research*, 7, 3, 718 – 724.
- Lee, M. R. e Elder, F. F. B. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic Cell and Genetic*, 26, 36 – 40.
- Leuzzi, M. S. P., Almeida, F. S. e Orsi, M. L. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 3, 335 - 362.
- Levan, A., Fredga K. e Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201 – 220.
- Lima, M. R., Salard-Cheboldaef, M. e Suguio, K. (1985). Étude palynologique de La formation Tremembé, Tertiary du Bassin de Taubaté (État de São Paulo, Bresil), d' après lês échantillons du sondage, 42 du Conselho Nacional de Petróleo, MME-DNPM, série Geologia, 27, 379 - 393.

- Ludwig, L. A. M., Gomes, E. e Artoni, R. F. (2005). Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Iguaçu. *Publicatio UEPG. Ciências biológicas e da saúde*, 11, 3/4, 23 - 27.
- Lundberg, J. G., Mago-Lecia, F. e Nass, P. (1991). *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South America and delimitation of the subfamily pimelodinae. *Proceedings Biological Society of Washington*. 104, 840 – 869.
- Lundberg, J. G. (1998). The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. S. eds. *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 49 - 68.
- Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L., e Wesselingh, F. (1998). The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. S. eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 13 - 65.
- Lundberg, J. G. e Littmann, M. W. (2003). Family Pimelodidae: long-whiskered catfishes. In Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. eds. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 432 - 446.
- Lundberg, J. G e Akama, A. (2005). *Brachyplatystoma capapretum*: a new species of goliash catfish from the Amazon basin, with a reclassification of allied catfishes (Siluriformes, Pimelodidae). *Copeia*, 3, 492 – 516.
- Lynch, M. e Milligan, B. G. (1994). Analysis of population structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91 - 99.
- Mantovani, M, Abel, L. D. S, Mestriner, C. A e Moreira-Filho O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 27, 536 – 542.
- Martins, C. e Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosomal Research*, 7, 363 – 367.
- Martins-Santos, I. C., H. F. Julio Jr. e I. Burin. (1996). Karyotypic studies of four species of the Sorubiminae subfamily (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*, 49, 73 - 80.
- Matoso, D. A., Artoni, R. F. e Galetti Jr., P. M. (2004). Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia*, 527, 223 – 225.

- Menezes, N. A., Ribeiro, A. C., Weitzman, S. e Torres, R. A. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726, 33 – 48.
- Mestriner, C. A., Bertollo, L. A. C e Galetti Jr, P. M. (1995) Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a sex system. *Chromosome Research*, 3, 440 – 443.
- Miller, M. P. (1997). Tools for population genetic analyses – TFPGA –1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. Software can be downloaded from <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.
- Murray, M. G. e Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321 – 4326.
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C. e Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM, 378p.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583 – 590.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the World*. John Wiley e Sons, New York. 600p.
- Oliveira, A. V., Prioli, A. J., Prioli, S. M. A. P., Pavanelli, C. S., Júlio Jr., H. F. e Panarari, R. S. (2002). Diversity and genetic distance in populations of *Steindoccherina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, 115, 259 - 267.
- Oliveira, C e Wright, J. M. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6, 205 – 211.
- Oliveira, C. e Gosztanyi, A. E. A. (2000). Cytogenetic study of *Diplomysues mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryologia*, 53, 1, 31 – 37.
- Oliveira, C., Joyce, S., Chew, K., Porto-Foresti, F., Dobson, M. J. e Wright, J. M. (1999). A LINE2 repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution *Chromosoma*, 108, 457 – 468.
- Oliveira, C., Wright, J. M. e Foresti, F. (2002). Chromosome Structure in Fishes. Some Aspects of Chromosome Structure and Functions. R. C. Sobti et al. eds. *Narosa Publishing House*, New Delhi, India.

- Page, R. D. M. e Holmes, E. C. (1998). *Molecular Evolution: a phylogenetic approach*. Malden, MA, USA: Blackwell Science Publishing, 346p.
- Partis, L. e Wells, R. J. (1996). Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*, 10, 435–441.
- Pendás, A. M., Morán, P, Freire, J. P. e Garcia-Vazquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67, 31-36.
- Pinkel D, Straume T e Gray J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad Sci*, 83, 2934–2938.
- Pinna, M. C. C. (1998). Phylogenetic Relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and Synthesis of Hypotheses. In Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. S. eds., *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 279-324.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Gomes, E. A., Tabata, Y. A., Rigolino, M. G. e Foresti, F. (2004). A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics and Molecular Biology*, 27, 51–54.
- Posada, D. e Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, 14, 817-818.
- Prioli, A. J., Sekine, E. S., Júlio Jr., H. F.; Prioli, S. M. A. P. (2002). Genetic diversity between populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces – Siluriformes) isolated by Guaíra Falls of the Paraná River. *Acta Scientiarum*, Maringá - PR, 24, 2, 507 – 512.
- Prioli, S. M. A. P., Prioli, A. J., Júlio Jr., H. F., Pavanelli, C. S., Oliveira, A. V., Carrer, H., Carraro, D. M. e Prioli, L. M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 421 – 430.
- Rabello, A. Queiroz, P. R., Simões, K. C. C., Hiragi, C. O., Lima, L. H. C., Oliveira, M. R. V. e Mehta, A. (2008). Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCR-RFLP and sequencing of the IS1 rDNA region. *Genetics and Molecular Research*, 31, 2, 585 – 590.
- Ramella, M. S., Kroth, M. A., Meurer, S., Nuñez, A. P. O., Filho, E. Z. e Arisi, A. C. M. (2006). Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 4, 589-598.

- Ribeiro, A. C. (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, 2, 225-246.
- Ribeiro, L. B., Matoso, D. A., Almeida, M. C., Vicari, M. R., Moraes-Neto, A., M. C. C. M., Svidnicki, Artoni, R. F. (2008). Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Genetics and Molecular Research*, 7, 718-724.
- Ringuelet, R. A., Aramburu, R. H. e Aramburu, A. A. (1967). Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica. La Plata, Provincia de Buenos Aires. 602.
- Rodríguez, F., Oliver, J. F., Marín, A. e Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142, 485-501.
- Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems; v. 2.02. Exeter software, *Applied Biostatistics*, N.Y., 225p.
- Ronquist, F. e Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572 – 1574.
- Ruta, C., Nygren, A., Rousset, V., Sundberg, P., Tiller, A., Wiklund, H. e Pleijel, F. (2007). Phylogeny of Hesionidae (Aciculata, Polychaeta), assessed from morphology, 18S rDNA, 28S rDNA, 16S rDNA and COI. *Zoologica scripta*, 36, 99-107.
- Rzhetsky, A e Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 945-967.
- Saitou N. e M. Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sambrook, J. e Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, L. B., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). 2 ed. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, Cold Spring Harbor.
- Sbisá, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. e Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-Loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205, 125-140.
- Schmid, M. e Guttenbach, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse fluorescence chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma*, 97, 101–114.

- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58, 307 – 324.
- Shibatta, O. A. e Bockmann, F. A. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. In: Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. Série Livros 23. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 109 – 113.
- Shibatta, O. A., Orsi, M. L., Benneman, S. T. e Silva-Souza, A. T. (2002). Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In Medri, M. E., Bianchini, E.; Shibatta, O. A.; Pimenta, J. A. A. Bacia do rio Tibagi. Londrina: Câmara Brasileira do Livro, p. 403 – 423.
- Sivasundar, A., Eldregde, B. e Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10, 407-417.
- Sneath, P. H. A. e Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco, Califórnia, USA.
- Sofia, S. H., Silva, C. R. M., Galindo, B. A., Almeida, F. S., Sodr e, L. M. K. e Martinez, C. B. R. (2006). Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from na urban stream. *Hydrobiologia*, 553, 245-254.
- Sol e-Cava, A. M. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conserva o. In: MATIOLI, S. R. Biologia Molecular. Ribeirão Preto: Holos,171-192.
- Souza, L., A. C. Swarça e A. L. Dias. (2004). Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) using AgNO₃, CMA₃ and FISH with the 18S rDNA probe. *Caryologia*, 57, 145-151.
- Souza, L., Giuliano-Caetano, L. e Dias, A. L. (2003). Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguai River Basin. *Cytologia*, 68, 4, 345 – 350.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 74, 304-306.
- Stepien, C. A. e Kocher, T. D. (1997). Molecules and Morphology in Studies of Fish Evolution. In: Kocher, T. D.; Stepien, C. A. Molecular Systematics of Fishes. Academic Press, London, p. 1 – 11.
- Swarça, A. C., Giuliano-Caetano, L. e Dias, A. L. (1999). Cytogenetic characterization through chromosomic banding of *Pirirampus pirinampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin Pr/ Brazil. *Caryologia*, 1-2, 31 – 35.

- Swarça, A. C., Cestari, M. M., Giuliano-Caetano, L. e Dias, A. L. (2001). Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Science*, 5, 51 – 55.
- Swarça, A. C. (2003). Contribuição à Citogenética dos Pimelodidae de Grande Porte: Estudos Cariotípicos de 4 espécies do “subgrupo” Sorubiminae. Curitiba (PR). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M. e Dias, A. L. (2003a). First chromosome data on *Steindachneridion scripta* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian rivers: Giemsa, CBG, G- and RE banding. *Genetics and Molecular Research*, 4, 734-741.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M. e Dias, A. L. (2003b). Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119, 87 – 92.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M. e Dias, A. L. (2005). First chromosome data on *Steindachneridion scripta* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) from Brazilian rivers: Giemsa, CBG, G-, and RE banding. *Genetics and Molecular Research*, 4, 4, 734 – 741.
- Swarça, A. C., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M., Bertollo, L. A. C. e Dias, A. L. (2006). Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). *Cytogenetic Genome Research*, 112, 325 – 328.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. e Nei, M. (1993). Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tamura, K., Nei, M. e Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596 – 1599.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A. e Tunnacliffe, J. (1992). Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerated primer. *Genomics*, 8, 718-725.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

- Thorpe, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. *Ann. Rev. Ecol Syst*, 13, 139 – 168.
- Torres, R. A.; Matoso, D. A. e Artoni, R. F. (2004) Genética de Peixes Neotropicais.II. Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. *Publicatio*, 10, 2, 27 – 37.
- Torres, R. A. (2006). Molecular taxonomy of *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Brasil, 23, 1235-1242.
- Torres, R.A., Motta, T.S., Nardino, D.N., Adam, M.L. e Ribeiro, J. (2007). Chromosomes, RAPDs and evolutionary trends of the Neotropical fish *Mimagoniates microlepis* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae) from coastal and continental regions of the Atlantic forest, Southern Brazil. *Acta Zoologica*, 88, (Doi: 10.1111/j.1463 6395.2007.00314.x)
- Treco, F. R., Malabarba, L. R., Giuliano-Caetano,L. e Dias, A. L. (2008). Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes) collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6, 1, 87 – 92.
- Vasconcelos, C. e Martins-Santos, I. C. (2000).Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132, 103 – 109,
- Vicari, M. R., Artoni, R. F., Moreira-Filho O. e Bertollo, L. A. C. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122, 67 – 72.
- Vissoto, P. C., Foresi, F. e Oliveira, C. (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3, 9 – 13.
- Vrijenhoek, R. C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53, 394 – 412.
- Wasko, A. P. e Galett Jr., P. M. (2002). RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474, 131-137.
- Wasko, A. P., C. Martins, C. Oliveira, J. A. Senhorini and F. Foresti (2004), Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes J. Appl. Ichthyol. 20 48–52.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. e Taylor, L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribossomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: *A guide to methods and applications*. Academic Press, New York/London.

- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. e Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids and Research*, 18, 6531 – 6535.
- Woodward, A. S. (1898). Considerações sobre alguns peixes Terciário dos schistos de Taubaté, Estado de São Paulo, Brazil. *Revista do Museu Paulista*, 3, 63 – 75.
- Wright, S. (1978). Evolution and Genetics of population. Volume 2: the theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Londres, 511p.,
- Yang, Z. H. e Rannala, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 714-724.
- Zwick, M. S., Hanson, R. E., McKnight, T. D., Islam-Faridi, H. M., Stelly, D. M., Wing, R. A. e Price, J. H. (1997). A rapid procedure for the isolation of *C0t-1* DNA from plants. *Genome*, 40, 138-142.