Keila Chiaratti de Oliveira Bressane

Estudos cromossômicos e moleculares no grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae).

Chromosomal and molecular studies in the group *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae).

São Paulo

2010

Keila Chiaratti de Oliveira Bressane

Estudos cromossômicos e moleculares no grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae).

Chromosomal and molecular studies in the group *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador(a): Lurdes Foresti de Almeida-Toledo

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Bressane, Keila Chiaratti de Oliveira

Estudos cromossômicos e moleculares no grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae).

148pp.

Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. grupo *Characidium lauroi*; 2. Citogenética; 3. DNA mitocondrial; I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo

(Mafalda - *Quino*)

Agradecimentos

Muitas pessoas participaram, direta ou indiretamente, da realização desta dissertação, contribuindo não apenas para minha formação profissional, mas para minha formação pessoal. A elas meus agradecimentos.

Em primeiro lugar agradeço à Profª Lurdes, pela oportunidade de me deixar fazer parte da equipe de seu laboratório, por todo o apoio na realização do meu trabalho, por toda confiança que deposita em mim e, especialmente, pela amizade que me ofereceu durante todos esses anos de convívio.

Ao Profº Paulo Andreas Buckup, por toda a ajuda durante o desenvolvimento do projeto, pelas ajudas nas coletas, na identificação dos indivíduos e, mais importante, por toda a paciência em me co-orientar. Ao pessoal do Museu Nacional por todo suporte e oportunidade de coletas, em especial ao Profº Marcelo Brito e a Priscila.

À CAPES, pelo auxilio financeiro recebido.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da USP/São Paulo, pela infraestrutura e oportunidade de realização do presente trabalho.

Ao Profº Carlos Ribeiro Vilela, por todo apoio, amizade e por ter me aceitado na monitoria de Genética com toda a paciência do mundo.

À Deisy e Helenice, por toda ajuda burocrática, por sempre estarem disponíveis, pelas conversas divertidas e pelo carinho dispensado a minha pessoa.

Aos queridos Eduardo, Leandro e Mário, que sempre fizeram de tudo para me ajudar a conseguir verbas da Proap (muito obrigada pelo dim-dim!!!).

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ictiogenética, que muito me ajudaram, mas que, principalmente, deram muita risada comigo: Daniella, Fred, Sabrina, Riviane, Vânia, Karina, Karine, Ricardo, Caroline, Claudia, Felippe, Marilena e Raquel.

Ao Carlos Eduardo Lopes, pela ajuda incalculável durante as coletas, por não deixar o frio afetar meu humor, sempre encorajando a continuar em frente e por me deixar comer docinhos de beira de estrada. Ao motorista Israel, com muito carinho, por ter me ajudado na coleta de Angra dos Reis. Ao amigo Mauro, pela presença nas coletas, ajudando muito a subir meu número amostral.

À minha mãe, por ter me dado condições emocionais e financeiras para correr atrás dos meus sonhos. Ao meu irmão Allan, por ter caído no golpe do “1 mês”, tendo me acolhido no seu pequeno apartamento e por ter sido um grande irmão, mesmo de mau humor. À minha irmã Grace, que mesmo de longe me apoiou em todos os sentidos a fazer esse mestrado. Ao meu sobrinho João Gabriel, por me permitir ser criança e relaxar sempre que nos encontramos e à minha mais nova sobrinha, Clara, por ter alegrado nossas vidas com a sua chegada.

Ao meu melhor amigo, namorado, companheiro e agora marido Ary, por estar sempre do meu lado, por me ajudar incondicionalmente, inclusive participando de coletas (o que não é uma tarefa fácil para não biólogos), por me manter sempre de bom humor e, simplesmente, por tudo o que representa na minha vida.

À minha nova família, que me acolheu com todo carinho: Regina, Eduardo, Felipe, Vó Catarina e todos os demais integrantes que não cito os nomes, porque a família é muito grande, mas que não por isso deixam de ser importantes na minha vida.

À amiga Carol, por todo incentivo acadêmico, ajuda laboratorial e paciência comigo, mesmo quando eu reclamava de o projeto ser com peixes tão pequeninhos. Agradeço-te por ter me irritado com bombinhas de gelo seco, com beijinhos estranhos

no coitado do meu braço, e também te agradeço por ter me alegrado com musiquinhas, churrascos, risadas, por estar presente em um dos momentos mais importantes da minha vida, enfim... obrigada por ser amiga.

À amiga Marcinha, por ter me ajudado bastante nesse finalzinho de projeto. Obrigada por se preocupar comigo, por se juntar com a Carol para me irritar ou me alegrar (sim, elas faziam isso juntas) e por estar sempre aqui, presente... para você também, obrigada por ser amiga.

À amiga Raquel, minha gêmea de mestrado desde a prova até a data de depósito, por ter percorrido esse caminho acadêmico ao meu lado, com muita alegria e carinho e por me mostrar muitas coisas novas da vida que me fizeram crescer muito pessoalmente... obrigada por estar comigo.

À amiga Claudinha, por estar sempre presente dando força e coragem nesse caminho estranho e por ser uma boa companhia de conversas, sempre amiga.

Ao amigo Douglas, por desvendar os mistérios do Photoshop e por ser um bom amigo.

Aos amigos do Poker: Bianca, Marco, Newton, Nilson e Graziella, por fazerem das sextas-feiras à noite um momento de alegria, conversas e fofocas e por serem amigos para todos os momentos.

Aos amigos Cléber, Leonardo, Paula, Vagner, Gabriel, Gisele, Flávia, Fernanda, Fabio e Loreta, por estarem presentes na minha vida desde a faculdade.

Obrigada a todos!!!

Índice

Lista de Figuras..... vii

Lista de Tabelas..... x

Resumo..... Xi

Abstract..... xiii

1. Introdução Geral..... 1

1.1. A Ordem Characiformes e a família Crenuchidae..... 2

1.2. O gênero *Characidium*..... 5

1.3. O grupo *Characidium lauroi*..... 6

1.4. Estudos Citogenéticos..... 10

1.5. Estudos Moleculares..... 18

1.5.1. O uso de PCR-RFLP e de sequenciamento de DNA em peixes..... 21

1.5.2. O uso do DNA *barcoding* em peixes..... 23

2. Objetivos..... 27

3. Material e Métodos..... 29

3.1. Locais de coleta e espécies coletadas..... 30

3.2. Procedimentos metodológicos citogenéticos..... 34

3.2.1. Estimulação de Mitoses..... 34

3.2.2. Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro*..... 34

3.2.3. Técnica de identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)..... 36

3.2.4. Técnica de obtenção de Regiões de Heterocromatina Constitutiva (Banda C)..... 36

3.2.5. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 18S..... 37

3.2.6. Coloração com fluorocromo base-específica Cromomicina A_3..... 41

3.2.7. Captura de Imagens..... 41

3.2.8. Montagem dos cariótipos..... 42

3.3. Procedimentos metodológicos moleculares..... 42

3.3.1. Extração salina de DNA..... 42

3.3.2. Amplificação dos genes mitocondriais..... 43

3.3.3. Técnica de PCR-RFLP..... 45

3.3.4. Reação de sequenciamento e precipitação..... 47

3.3.5. Obtenção e análise das sequências..... 48

3.3.6. Análises filogenéticas..... 49

Capítulo 1: Estudos citogenéticos e moleculares no gênero *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae), com enfoque no grupo *C. lauroi*..... 51

Capítulo 2: O uso do DNA barcoding na identificação de espécies do gênero *Characidium*, com enfoque no grupo *C. lauroi*..... 80

Capítulo 3: Relações filogenéticas entre espécies do grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae), com base em sequências de genes mitocondriais..... 93

Conclusões Gerais..... 109

Referências Bibliográficas..... 113

Anexo 1..... 136

Anexo 2..... 146

Lista de Figuras

Figura 1: Cladograma correspondente à hipótese de parcimônia das relações entre os peixes da ordem Characiformes. Grupos monofiléticos são identificados por números arábicos e as politomias são identificadas por T3 e T21. A seta indica a posição da família Crenuchidae (modificado de Buckup, 1998)..... 4

Figura 2: Distribuição geográfica da família Crenuchidae (Fonte: Buckup, 1993b)..... 5

Figura 3: Cladograma do grupo *C. lauroi* obtido por Melo (2001)..... 8

Figura 4: Mapa de distribuição das espécies do grupo *lauroi*, sobreposto à filogenia proposta (com modificações – Melo, 2001). Legenda: 1 – *C. japuhybense*; 2 – *Characidium* sp. "piabanha"; 3 – *C. lauroi*; 4 – *C.oiticicai*; 5 – *C. schubarti*; 6 – *Characidium* sp. "iguaçu"..... 9

Figura 5: Esquema ilustrativo da organização do genoma mitocondrial em vertebrados (Fonte: Passarge, 1995)..... 19

Figura 6: Espécies do gênero *Characidium* coletadas pertencentes ao grupo *C. lauroi*. A – *C. lauroi*; B – *C. japuhybense*; C – *C. oiticicai*; D – *C. schubarti* (sma); E – *Characidium* sp. "piabanha"; F – *Characidium* sp.2. 33

Figura 7: Espécies do gênero *Characidium* coletadas não pertencentes ao grupo *C. lauroi*: A – *C. lanei*; B – *C. pterostictum*; C – *Characidium* cf. *zebra*..... 33

Figura 8: Cariótipos de *Characidium lauroi*. A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. 70

Figura 9: Cariótipos de *Characidium* sp. "piabanha". A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. 71

Figura 10: **Figura 10**: Cariótipos de *Characidium japuhybense*. A– cariótipo de macho. B, C, D, E e F - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.. 72

Figura 11: Cariótipos de *Characidium schubarti*. A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. 73

Figura 12: Cariótipos de *Characidium schubarti* (p2). A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. 74

Figura 13: Cariótipos de *Characidium schubarti* (sma). A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. 75

Figura 14: Cariótipos de *Characidium* sp.1. A, B, C, D, e E – cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente..... 76

Figura 15: Cariótipos de *Characidium* cf. *zebra*. A, B, C, D e E – cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente..... 77

Figura 16: Mapas de restrição construídos com base nos cortes apresentados por cada enzima. As letras significam os haplótipos atribuídos para cada corte encontrado..... 78

Figura 17: Árvore UPGMA construída com base nos haplótipos conjugados obtidos pela técnica de PCR-RFLP. (L – *C. lauroi*; P – *C.* sp. "piabanha"; O – *C. oiticicai*; J – *C. japuhybense*; I – *Characidium* sp.2; ST – *C. schubarti* (sma); SI – *C. schubarti*; SS – *C. schubarti* (p2); X – *Characidium* sp.1; Z – *C.* cf. *zebra*). 79

Figura 18: Reconstrução filogenética baseada em sequências do COI com todas as espécies do presente trabalho, mostrando valores de bootstrap acima de 50%. Ao lado do nome das espécies está relacionado o número de tombo do Lab. de Ictiogenética. Os ramos em destaque são das espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi*. 91

Figura 19: Gráficos da freqüência observada de transições (S) e transversões (V) *versus* a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para os genes (A) ATPase 6 e 8, (B) Citocromo b, (C) todas as regiões gênicas concatenadas. 108

Figura 20: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas, de todas as espécies estudadas do presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas. 109

Figura 21: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia, com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas, de todas as espécies estudadas do presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores em preto correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas e os valores em vermelho, aos índices de Bremer. 109

Figura 22: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas. 147

Figura 23: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies estudadas do presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas. 147

Figura 24: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies estudadas do presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas. 148

Figura 25: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies estudadas do presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas..... 148

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados cromossômicos para o gênero *Characidium*..... 11

Tabela 2: Espécies estudadas, seus respectivos pontos de coleta e as técnicas aplicadas no presente trabalho..... 31

Tabela 3: Comprimento padrão médio das espécies do gênero *Characidium* estudadas no presente trabalho (Fonte: *FishBase*; Melo, 2001)..... 32

Tabela 4: Relação dos sítios e corte das enzimas utilizadas na técnica de PCR-RFLP..... 46

Tabela 5: Haplótipos obtidos para cada enzima por população..... 79

Tabela 6: Divergência nucleotídica entre as espécies estudadas referente à Figura 18..... 92

Tabela 7: Caracterização da informação filogenética contida em cada um dos genes mitocondriais empregados no presente estudo..... 107

Resumo

O grupo *Characidium lauroi* pertence ao gênero *Characidium* e é formado por seis espécies, *C. lauroi*, *Characidium* sp. "piabanha", *C. japuhybense*, *C. oiticicai*, *C. schubarti*, e *Characidium* sp. "iguaçu", que se distribuem nas bacias do Rio Paraíba do Sul, Drenagens Costeiras da Baía de Ilha Grande, Rio Tietê, Rio Paranapanema e Rio Iguaçu, respectivamente. Os estudos disponíveis sobre as relações evolutivas entre as espécies que compõem esse grupo baseiam-se em dados morfológicos que, entretanto, não foram suficientes para resolver as relações entre *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. "iguaçu". Estudos citogenéticos ou moleculares não foram aplicados até agora às espécies do gênero *Characidium* com o intuito de verificar a existência do grupo *C. lauroi*. Técnicas que envolvem o uso de DNAmt, como PCR-RFLP, DNA *barcoding* e sequenciamento podem auxiliar na resolução dessa questão, uma vez que as espécies do gênero *Characidium* formam um grupo interessante para a aplicação dessas técnicas, principalmente por apresentar algumas espécies com limites taxonômicos muito próximos, como as espécies que compõem o grupo *C. lauroi.* No presente estudo, técnicas de citogenética clássica e molecular, assim como a técnica de PCR-RFLP, o uso do DNA *barcoding* e sequenciamento foram utilizados na tentativa de analisar e elucidar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Characidium*, principalmente com enfoque nas relações entre as espécies do grupo *C. lauroi*. Os resultados citogenéticos encontrados indicam que esse grupo de espécies pode ser definido pela presença de cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW portadores de cístrons ribossomais e pela presença de um cariótipo relativamente estável. No entanto, essas características não estão restritas ao grupo *C. lauroi*. Os resultados de PCR-RFLP, assim como os resultados obtidos por meio do DNA

barcoding e sequenciamento, indicam que as espécies *C. lauroi* e *C.* sp. “piabanha” podem formar uma única espécie, da mesma forma que as populações de *C. schubarti*. No entanto, as espécies do grupo *C. lauroi* não formam um grupo monofilético. A relação entre as espécies do grupo *C. lauroi* com *C. pterostictum* e *C. lanei* pode indicar que essas espécies tenham passado por uma separação recente e que, não necessariamente essas duas espécies façam parte do grupo *C. lauroi*, mas sim que fazem parte de um grupo maior de espécies do gênero *Characidium*, o que é corroborado até por dados citogenéticos. Comparações entre as topologias encontradas com base em dados morfológicos e moleculares e suas implicações na delimitação e nas relações encontradas entre as espécies do grupo *C. lauroi* são discutidas.

Abstract

The group *Characidium lauroi* belongs to the genus *Characidium* and consists of six species, *C. lauroi*, *Characidium* sp. “piabanha”, *C. japuhybense*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* and *Characidium* sp. “iguaçu”; which are distributed in the basins of the Paraiba do Sul River, Drainage Coastal Bay of Ilha Grande, Tietê River, Paranapanema River and Iguaçu River, respectively. Available studies on the evolutionary relationships between species that make up this group are based on morphological data, however, were not sufficient to address the relationship between *C. oiticicai*, *C. schubarti* and *Characidium* sp. “iguaçu”. Cytogenetic and molecular studies have not been applied so far to the species of the genus *Characidium* in order to verify the existence of group *C. lauroi*. Techniques that involve the use of mtDNA, such as PCR-RFLP, DNA *barcoding* and sequencing may help in resolving this issue, since the genus *Characidium* form an interesting group for the application of these techniques, mainly for some species with taxonomic boundaries very close, as the species that make up group *C. lauroi*. In this study, techniques of classical and molecular cytogenetics, as well as PCR-RFLP, the use of DNA *barcoding* and sequencing were used in an attempt to analyze and elucidate the phylogenetic relationships among species of the genus *Characidium*, mainly focusing on relations between species of group *C. lauroi*. The cytogenetic results obtained indicate that this group of species can be defined by the presence of sex chromosomes differentiated ZZ / ZW carrying ribosomal cistrons and the presence of a relatively stable karyotype. However, these features are not restricted to the group *C. lauroi*. The results of PCR-RFLP and the results obtained by *barcoding* DNA and the sequencing, indicate that *C. lauroi* and *Characidium* sp. “piabanha” may form a single species, in the same way that populations of *C. schubarti*. However, the

species of group *C. lauroi* not form a monophyletic group. The relationship between species of group *C. lauroi* with *C. pterostictum* and *C. lanei* may indicate that these species have experienced a recent separation and, not necessarily these two species are part of group *C. lauroi*, but they are part of a larger group of species of the genus *Characidium*, which is supported even by cytogenetic data. Comparisons between the topologies found based on morphological and molecular data and its implications for delimitation and relationships found between species of group *C. lauroi* are discussed.

Introdução Geral

1. Introdução Geral

1.1. A Ordem Characiformes e a família Crenuchidae

Os peixes exibem enorme diversidade em termos morfológicos, em seus hábitos de vida e em sua biologia. Compreendem um grupo com aproximadamente 28.000 espécies, cerca de metade da fauna de vertebrados viventes atualmente, e esse número pode atingir 32.500, quando toda a sua diversidade for estudada (Nelson, 2006).

Dentro dessa enorme diversidade de peixes, é possível destacar a ordem Characiformes, representada por peixes exclusivos de água doce. Os peixes dessa ordem são popularmente conhecidos como piranhas, lambaris e traíras. Podem ser encontrados na África central até o Rio Nilo e do norte da América Central até o sul da America do Sul, estando ausentes nos continentes Europeu, Asiático e Australiano (Reis *et al*., 2003; Nelson, 2006).

Morfologicamente, os peixes dessa ordem podem ser caracterizados pelo corpo coberto de escamas, pela ausência de barbilhões sensitivos, presença de nadadeira adiposa, nadadeira anal e nadadeira pélvica, presença de linha lateral decurvada e, às vezes, incompleta e dentes bem desenvolvidos, entre outras características (Nelson, 2006). Podem atingir 1,4 metros de comprimento, como a espécie africana *Hydrocynus goliath*, ocorrendo também espécies miniaturizadas, com menos de 3 cm de comprimento, como por exemplo a espécie *Microcharacidium weitzmani*, que mede 1,2 cm. Seus representantes podem ser muito coloridos ou, muitas vezes, de coloração acinzentada. Alguns são comercializados em lojas de aquários (família Characidae) e outros são utilizados como importante fonte de alimentação (gênero *Brycon*). Apresentam uma vasta especialização trófica, abrangendo animais detritívoros, herbívoros, planctívoros, predadores lepdófagos (que se alimentam de escamas) e carnívoros vorazes (Nelson, 2006).

Devido à grande diversidade encontrada na ordem Characiformes, o estabelecimento de suas relações filogenéticas nos diferentes níveis taxonômicos e a compreensão de sua história evolutiva é considerado uma tarefa difícil.

Um exemplo dessa dificuldade pode ser constatado na divisão dessa ordem, que pode ser agrupada em 14 (Géry, 1977), 16 (Greenwood *et al*., 1966) ou 18 famílias (Buckup, 1998), por divergências quanto à delimitação da família Characidae, quando são considerados os caracteres morfológicos. Em um estudo baseado em dados moleculares, Calcagnotto *et al*. (2005) também obtiveram, como resultado de seu trabalho, a divisão da ordem Characiformes em 18 famílias. Com relação, portanto, às filogenias mais recentes, os representantes dessa ordem estão distribuídos em 18 famílias, com aproximadamente 1700 espécies, sendo essa ordem de peixes considerada a mais diversa da Região Neotropical (Reis *et al.*, 2003; Nelson, 2006).

Dentro dessa ordem, a família Crenuchidae, composta por duas subfamílias, Crenuchinae e Characidiinae, já foi agrupada de forma distinta da atual, sendo Characidiinae considerada uma subfamília de Characidae. Buckup (1998) mostrou as relações entre Characidiinae e Crenuchinae, demonstrando a atual composição da família Crenuchidae (Figura 1). A subfamília Crenuchinae é composta por dois gêneros – *Crenuchus* e *Poecilocharax* - e a subfamília Characidiinae, composta por dez gêneros – *Ammocryptocharax, Characidium, Elachocharax, Geryichthys, Klausewitzia, Leptocharacidium, Melanocharacidium, Microcharacidium, Odontocharacidium* e *Skiotocharax* (Nelson, 2006).

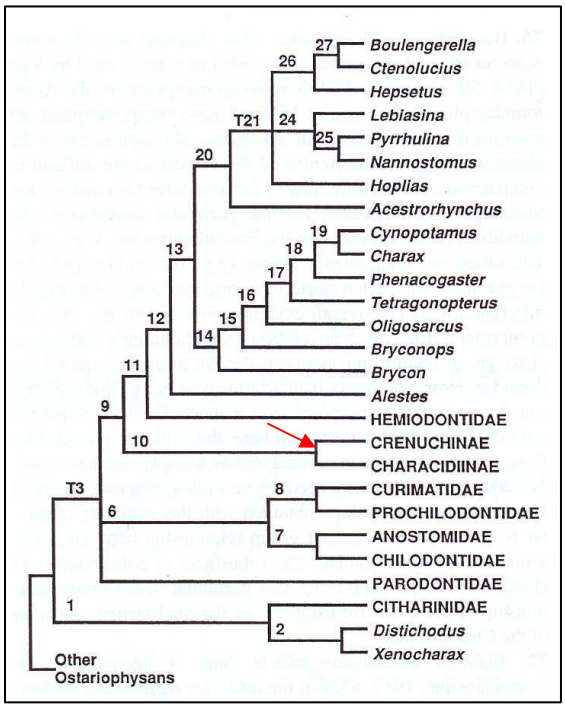


Figura 1: Cladograma correspondente à hipótese de parcimônia das relações entre os peixes da ordem Characiformes. Grupos monofiléticos são identificados por números arábicos e as politomias são identificadas por T3 e T21. A seta indica a posição da família Crenuchidae (modificado de Buckup, 1998).

Os peixes da família Crenuchidae estão presentes na maioria das drenagens de água doce da região Neotropical, distribuídos do leste do Panamá ao leste da Argentina (Figura 2) (Buckup, 1993b). No entanto, a maior parte da diversidade da família está situada em drenagens ao redor da Bacia do Rio Orinoco e do Rio Amazonas, que abrigam a maioria dos gêneros descritos para a família, com exceção do gênero *Characidium*, o qual constitui o táxon mais amplamente distribuído e rico em número de espécies (Buckup, 1993a, 2003; Nelson, 2006).

Os representantes da subfamília Characidiinae, à qual pertence o gênero *Characidium*, raramente ultrapassam 10 cm de comprimento padrão, e a maioria deles habita pequenos córregos de escoamento rápido, onde freqüentemente gravitam ao redor de fendas, rochas e vegetação (Buckup, 1993b). Alguns ocorrem em cachoeiras rápidas e pequenas, onde são encontrados aderindo ao substrato ou escalando plantas aquáticas, sendo reportada para a

espécie *Characidium timbuiense*, a habilidade de escalar paredes verticais (Buckup *et al*., 2000).

Figura 2: Distribuição geográfica da família Crenuchidae (Fonte: Buckup, 1993b).

1.2. O gênero *Characidium*

Apesar de ser considerado o gênero mais amplamente distribuído e rico da família Crenuchidae, com alta representatividade nas coleções de museus, o gênero *Characidium* é considerado pouco conhecido, incluindo vários táxons ainda em processo de descrição (Buckup, 1993b). A principal razão desta lacuna está na dificuldade de reconhecer as espécies, já que a maior parte das descrições do grupo foi realizada de maneira precária há mais de meio século, sendo que apenas espécies capturadas em suas localidades-tipo podem ser seguramente identificadas, e a maioria das identificações requer consultas às descrições originais (Melo, 2001).

Apesar disso, Buckup (1993a) propôs alguma relação evolutiva entre as espécies do gênero *Characidium*, com base em caracteres morfológicos, porém essa não foi realizada com muitos representantes do gênero.

No entanto, é possível notar uma relação de proximidade entre algumas espécies, o que caracteriza a formação de grupos para o gênero *Characidium*. Um desses grupos está relacionado à espécie *C. occidentale* e suas relações com *C. orientale*, *C. vespertinne*, *C. rachovii* e *C. stigmosum*, cuja monofilia é baseada em quatro sinapomorfias: presença de manchas pretas arredondadas na nadadeira pélvica, dorsal e anal; presença de uma faixa preta ao longo de margem distal das nadadeiras anal e pélvicas (principalmente em adultos do sexo masculino); nadadeira anal alargada, com perfil arredondado distal em adultos do sexo masculino; e nadadeiras coloridas com cromatóforos laranja ou vermelho em adultos do sexo masculino (Buckup e Reis, 1997; Buckup e Hahn, 2000; Melo e Buckup, 2002); os autores propuseram que a estreita relação entre essas espécies é indicativa de uma história biogeográfica comum compartilhada entre as bacias do Rio Uruguai e a Laguna dos Patos, onde elas ocorrem (Buckup e Hahn, 2000).

1.3. O grupo *Characidium lauroi*

Anteriormente aos trabalhos comentados acima, Travassos (1949; 1955; 1956; 1967) elaborou pesquisas sobre a formação de um grupo para o gênero, relacionado à espécie *Characidium lauroi*, porém, sem estabelecer qualquer hipótese evolutiva entre as espécies que estudou. Primeiramente, o autor evidenciou a proximidade entre *C. lauroi* e *C. schubarti* ("a forma alongada da nova espécie *Characidium schubarti*, a traz para junto de *Ch. lauroi*") (Travassos, 1955) e, posteriormente, a existência do "*grupo Characidium lauroi*" durante a descrição de *Characidium oiticicai (*"*Characidium oiticicai*, sp. n., *lauroi-group*, is very close

to *Characidium japuhybensis*...”(Travassos, 1967). Entretanto, os limites taxonômicos e caracteres diagnósticos do grupo não foram mencionados (Melo, 2001).

Buckup (comunicação pessoal) observou que essas quatro espécies descritas por Travassos (*C. lauroi, C. japuhybense, C. schubarti e C. oiticicai*) apresentam um padrão característico de pigmentação (pequenas máculas distribuídas ao longo do flanco e barras transversais pouco marcadas) e que essas espécies encontram-se restritas aos pequenos riachos montanhosos de primeira e segunda ordem da região de Mata Atlântica do sul e sudeste, caracterizados pela presença de corredeiras e cachoeiras de água cristalina, com altitude superior a 800 metros e temperatura freqüentemente baixa (Caramaschi, 1986; São Tiago, 1990; Melo, 2001).

Melo (2001), na tentativa de estabelecer as relações filogenéticas das espécies do grupo *C. lauroi*, com base em caracteres morfológicos, apesar de descrever mais duas espécies pertinentes ao grupo (*Characidium* sp. “piabanha” *e Characidium* sp. “iguaçu”), não conseguiu estabelecer as relações entre *C. schubarti, C. oiticicai e Characidium* sp. “iguaçu”, tendo resolvido, entretanto, a posição de *C. japuhybense* como basal na filogenia, e as relações entre *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha”, como espécies irmãs mais derivadas, como mostra a Figura 3.

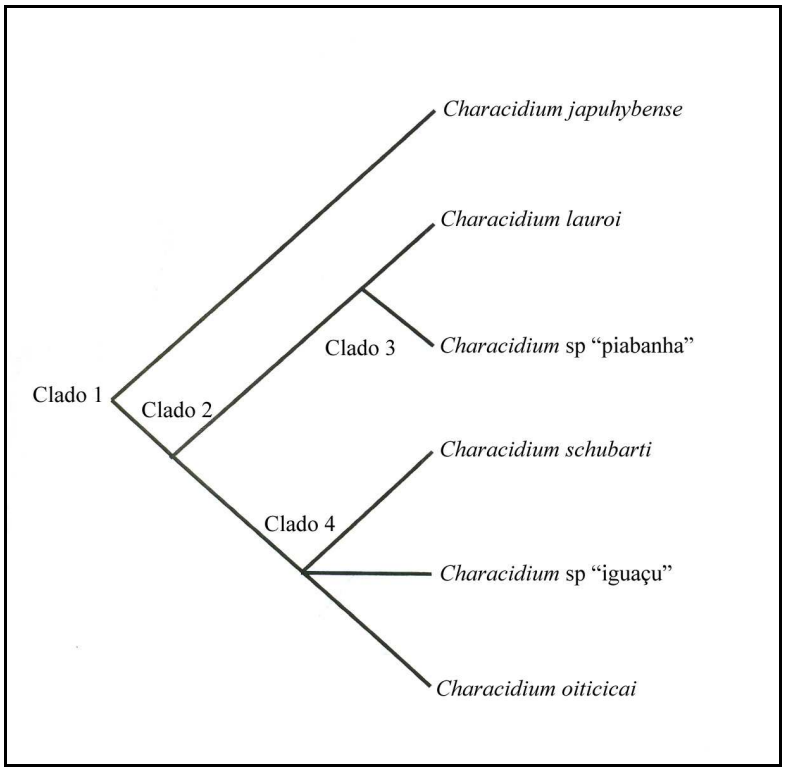


Figura 3: Cladograma do grupo *C. lauroi* obtido por Melo (2001).

As espécies desse grupo podem ser encontradas nos riachos tributários dos trechos alto e médio superior do Rio Paraíba do Sul, no caso de *C. lauroi*; nos pequenos riachos costeiros da baía da Ilha Grande, no caso de *C. japuhybense*; nos pequenos riachos tributários da bacia do rio Paranapanema, no caso de *C. schubarti*; nos riachos tributários do alto rio Tietê, a leste de São Paulo, no caso de *C. oiticicai*; nos riachos da vertente oeste da Serra dos órgãos, tributário do rio Piabanha, tributário da margem direita do rio Paraíba do sul, no caso de *Characidium* sp. "piabanha"; e nos riachos da face sudoeste da Serra da Esperança, tributários da margem direita do rio Iguaçu, no caso de *Characidium* sp. "iguaçu", como pode ser visto no mapa da Figura 4.

O padrão de distribuição dessas espécies se encaixa no modelo de especiação alopátrica, segundo o qual barreiras vicariantes, como os eventos de separação das bacias e as variações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno, são responsáveis pela segregação das

populações ancestrais em áreas diferentes, como pode ser observado na sobreposição do cladograma das espécies sobre o mapa de distribuição na Figura 4 (Melo, 2001).

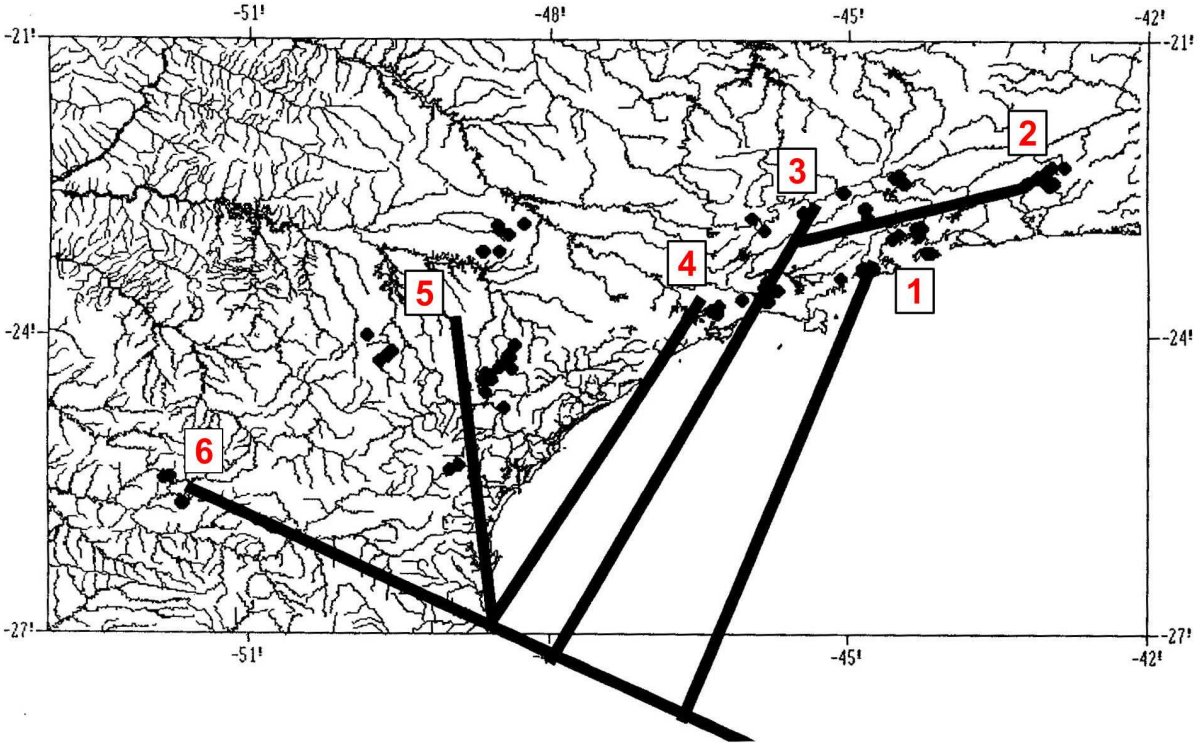


Figura 4: Mapa de distribuição das espécies do grupo *lauroi*, sobreposto à filogenia proposta (com modificações – Melo, 2001). Legenda: 1 – *C. japuhybense*; 2 – *Characidium* sp. "piabanha"; 3 – *C. lauroi*; 4 – *C.oiticicai*; 5 – *C. schubarti*; 6 – *Characidium* sp. "iguaçu".

Melo (2001) propôs que a posição de *C. japuhybense* como espécie basal dentro do grupo pode ser corroborada pela relação de proximidade entre as espécies que ocorrem nas bacias do Rio Tietê, Paraíba do Sul, Ribeira do Iguape e Rio Iguaçu, e que essa relação pode demonstrar que as cabeceiras do Paranapanema, Iguaçu e Ribeira do Iguape também faziam parte de um sistema comum ao alto Paraíba do Sul/Tietê. As hipóteses propostas para a resolução do cladograma para as espécies restritas a essas bacias revelam que, ou o isolamento das cabeceiras do Iguaçu é o evento mais antigo em relação à separação do Paranapanema, Tietê e Ribeira do Iguape, ou que as cabeceiras do Paranapanema teriam se

separado primeiro, deixando unidas as cabeceiras do Iguaçu com Tietê, através do Ribeira do Iguape. Esse mesmo autor também propõe que a monofilia de *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha” sugere que as populações ancestrais teriam se separado após o aumento do volume do rio Paraíba do Sul, um evento recente que não permitiu ainda que as populações de *C. lauroi* fixassem caracteres autoapomórficos (Melo, 2001).

A presença das espécies do grupo *C. lauroi* em riachos montanhosos com mais de 800 metros de altitude pode ser facilmente explicada pela elevação da temperatura global no final do Pleistoceno e início do Holoceno, que forçaram o isolamento das populações do grupo *C. lauroi* a riachos de cabeceiras das áreas de grande altitude, revelando a atual distribuição dessas espécies (Melo, 2001).

Apesar de o trabalho de Melo (2001) ter resolvido as relações entre algumas das espécies desse grupo, a politomia observada (Figura 3) é carente de estudos mais aprofundados para determinação correta das relações evolutivas entre as espécies do grupo *Characidium lauroi*.

1.4. Estudos Citogenéticos

Dados citogenéticos, que poderiam ajudar na elucidação da questão descrita acima, estão disponíveis apenas para poucas espécies do gênero *Characidium* (Tabela 1).

Tabela 1: Dados cromossômicos para o gênero *Characidium*.

Espécie	2n (fórmula cariotípica)	RONs (par)	CS	B	18S	5S	Localidade	Ref.
C. cf. *zebra*	50 (32m + 18sm)	Múltipla					Rio Mogi-Guaçu – Luis Antônio, SP	1
	50 (32m + 18sm)	25		0-1			Rio Passa-Cinco – Ipeúna, SP	1
	50 (32m + 18sm)	25					Rio Piracicaba – SP	1
	50 (32m + 18sm)	23					Córrego Paiol Grande – São Bento do Sapucaí, SP	2
	50 (32m + 18sm)	23					Rio Machado – São João da Mata, MG	3
	50 (32m + 18sm)	23					Rio Piraitinga – Salesópolis, SP	4
C. gomesi	50 (32m + 18sm)	17					Rio Machado – São João da Mata, MG	3
	50 (32m + 18sm ♂; 31m + 19sm♀)	18	ZZ/ZW				Córrego Paiol Grande – São Bento do Sapucaí, SP	2
	50 (32m + 18sm)	17	ZZ/ZW	0-4			Rio Pardo – Botucatu, SP	5, 6
	50 (32m + 18sm ♂; 31m + 18sm + 1st ♀)	Múltipla	ZZ/ZW		10	2	Rio Quebra Perna – PR	7
C. pterostictum	50 (32m+16sm+2st)						Estação Ecológica de Carlos Botelho – São Miguel Arcanjo, SP	1
	50 (32m+16sm+2a ♂; 31m + 16sm + 1st + 2a ♀)	Sexual	ZZ/ZW	0-2			Rio Betari – Apiaí, SP	4
C. lanei	50 (32m + 18sm)	Sexual	ZZ/ZW				Córrego Cari – Morretes, PR	4
	50 (32m + 16sm + 2a ♂; 31m + 16sm + 1st + 2a ♀)	Sexual	ZZ/ZW		2	2	Rio Barroca – PR	8
C. lauroi	50 (24m + 24sm + 2st)	5 e 23					Ribeirão Grande – Pindamonhangaba, SP	9
	50 (32m + 18sm)	Sexual	ZZ/ZW				Tributário Rio Grande – Ubatuba, SP	4
C. oiticicai	50 (32m + 18sm ♂; 31m + 18sm + 1st ♀)	Sexual	ZZ/ZW	0-3			Rio Piraitinga – Salesópolis, SP	4

Tabela 1: Dados cromossômicos para o gênero *Characidium* (**continuação**).

Espécie	2n (fórmula cariotípica)	RONs (par)	CS	B	18S	5S	Localidade	Ref.
C. schubarti	50 (32m + 18sm ♂; 31m + 19sm ♀)	Sexual	ZZ/ZW				Rio Cinco Réis – Jaguariaíva , PR	4
Characidium sp.	50 (32m + 18sm ♂; 31m + 19sm ♀)	Sexual	ZZ/ZW				Tributário do Rio Preto – Itanhaém, SP	4
C. cf. *alipioi*	50 (30m + 20sm)	16	ZZ/ZW				Ribeirão Grande – Pindamonhangaba, SP	9
C. lagosantensis	50 (32m + 18sm)						Rio Mogi-Guaçu – Luis Antônio, SP	1

Legenda: 2n – número diplóide; RONs – regiões organizadoras de nucléolo; CS – cromossomo sexual; B – cromossomo B; 18S – número de marcações de DNAr 18S; 5S – número de marcações de DNAr 5S; Ref. – referências bibliográficas; m – cromossomo metacêntrico; sm – cromossomo submetacêntrico; st – cromossomo subtelocêntrico; a – cromossomo acrocêntrico. 1 – Miyazawa e Galetti Jr. (1994); 2 – Centofante *et al.* (2001); 3 – Silva e Maistro (2006); 4 – Alves *et al*. (2010); 5 – Maistro *et al.* (1998); 6 – Maistro *et al.* (2004); 7 – Vicari *et al*. (2008); 8 – Noletto *et al.* (2009); 9 - Centofante *et al.* (2003).

Os estudos citogenéticos disponíveis para o gênero *Characidium* têm evidenciado um padrão relativamente estável em relação ao número diplóide, sendo que todas as espécies apresentam 2n=50 cromossomos de dois braços. Com exceção de duas populações de *C. pterostictum*, uma que apresenta um par de cromossomos acrocêntricos (Alves *et al*., 2010), e outra, um par de cromossomos subtelocêntricos (Miyazawa e Galetti Jr, 1994); de *C. lauroi*, que apresenta um par de cromossomos subtelocêntricos (Centofante *et al.*, 2003), e de *C. lanei*, que apresenta um par de cromossomos acrocêntricos (Noletto *et al.*, 2009), as demais espécies estudadas têm seu complemento padrão composto somente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, apresentando pouca variação em sua fórmula cariotípica.

Essa variação na fórmula cariotípica deve-se à presença de cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW (Centofante *et al.*, 2001; Centofante *et al.*, 2003; Maistro, *et al.*, 2004, 1998; Vicari *et al*., 2008; Noletto *et al.*, 2009; Alves *et al*., 2010). Para esse gênero, o cromossomo W apresenta, entre as espécies estudadas, variações quanto a sua morfologia e padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, em geral, apresentando-se totalmente heterocromático, enquanto que o cromossomo Z apresenta-se conservado em relação a sua morfologia, com poucas variações no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva.

Embora a maioria dos peixes Neotropicais não apresente cromossomos sexuais diferenciados, seis sistemas sexuais distintos já foram identificados para esse grupo (Moreira-Filho *et al*., 1993; Almeida-Toledo *et al*, 2001; Alves, *et al*., 2006). Esses sistemas podem ser simples (ZZ/ZW, XX/XY e XX/X0) ou múltiplos (XX/XY_1Y_2 e $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e ZZ/ZW_1W_2) e, algumas ocorrências em determinados grupos sugerem que esses sistemas apresentam origens distintas e que, possivelmente, sejam caracteres derivados. Exemplos disso são as famílias Erythrinidae e Parodontidae (Bertollo *et al*., 1979, 1983; Moreira-Filho *et al*., 1993; Bertollo *et al*., 2000), e o gênero *Eigenmannia* (Almeida-Toledo *et al*., 1984), nas quais ocorrem diferentes tipos de sistemas de cromossomos sexuais entre as espécies.

Por outro lado, o estudo de nove espécies/populações de *Triportheus*, gênero de peixe de ampla distribuição geográfica na América do Sul, evidenciou a ocorrência do sistema de cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW em todas essas espécies/populações, sendo que o cromossomo W apresentou-se diferente em relação a sua morfologia (Artoni *et al*., 2001; Margarido e Galetti Jr., 1999). A existência desse sistema sexual em todas as espécies analisadas representa uma sinapomorfia, ou seja, uma característica basal para todas as espécies do gênero *Triportheus*, não estando presente em outros gêneros da família Characidae, como *Brycon* e *Salminus* (Diniz *et al*., 2008).

Para o gênero *Characidium*, a ausência de um sistema diferenciado de cromossomos sexuais na espécie *Characidium* cf. *zebra*, morfologicamente a mais primitiva do gênero (Buckup, 1993a), pode ser considerada uma condição plesiomórfica para o gênero. No entanto, a presença de um sistema cromossômico diferenciado do tipo ZZ/ZW em algumas espécies do gênero poderia indicar a existência de uma condição sinapomórfica relativamente restrita a um determinado grupo dentro do gênero (Alves, 2006).

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) são amplamente visualizadas entre os peixes pelo fato de a técnica de impregnação por nitrato de prata (Ag-RONs) ser de simples aplicação, tornando-a um importante marcador citogenético para esse grupo de animais. No entanto, essa técnica apresenta limitações, pois somente as regiões que estavam ativas na expressão gênica da interfase anterior são evidenciadas (Miller *et al*., 1976). A melhor visualização dessas regiões pode ser feita por meio da técnica de “hibridação *in situ* fluorescente” (FISH), que permite a localização de regiões específicas do DNA, no caso o DNA ribossomal (DNAr), independente da sua atividade na interfase. Em vertebrados, o DNA ribossômico é organizado em duas classes distintas, a classe maior DNAr 45S, que transcreve os genes ribossomais 18S, 5.8S e 28S, e a classe menor 5S, que transcreve os genes ribossomais 5S. A localização do DNAr 18S em peixes é coincidente com as marcações de

RONs, porém a localização do DNAr 5S não apresenta essa mesma relação (Martins e Galetti Jr., 2004).

Com relação às RONs, as espécies do gênero *Characidium* apresentam um conservadorismo relativo à morfologia do par cromossômico portador de Ag-RONs, sendo que apenas cromossomos do tipo submetacêntrico apresentam essas sequências em posição terminal ou intersticial. Apesar de RONs simples serem as mais freqüentes dentro do gênero, RONs múltiplas foram encontradas em *Characidium* cf. *zebra* e *C. gomesi* (Vicari *et al*.,2008; Miyazawa e Galetti Jr., 1994).

Para as espécies do gênero *Characidium* que apresentam cromossomos sexuais diferenciados, as RONs podem ser visualizadas nesses cromossomos, como ocorre em *C. pterostictum, C. lauroi* e *C. schubarti* (Alves *et al*., 2010), e em duas populações de *C. lanei* (Noletto *et al*., 2009; Alves *et al*., 2010). A espécie *C. gomesi* também apresenta RONs em cromossomos sexuais (Vicari *et al*., 2008), porém, em algumas populações estudadas dessa espécie, a visualização das RONs ocorre em um par cromossômico não sexual, da mesma forma que ocorre para a espécie *Characidium* cf. *alipioi* (Centofante *et al*., 2003).

A ocorrência de DNAr em cromossomos sexuais tem sido observada em vários grupos de animais, como em insetos (Pellegrini *et al*., 1977; Juan *et al*., 1993; Parise-Maltempi e Avancini, 2001) e mamíferos (Yonenaga-Yassuda *et al*., 1983; Oshida *et al*., 1999). Em peixes, essa ocorrência restringe-se, até agora, a *Fundulus diaphanus* (Howell e Black, 1979), *Salvelinus alpinus* (Reed e Phillips, 1997), *Triportheus guentheri* (Artoni, 1999), *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000) e *Hisonotus* sp. A (Andreata *et al*., 2002).

Alves (2006) sugere, em sua dissertação de mestrado, que a presença de Ag-RONs em cromossomos sexuais no gênero *Characidium* seja anterior aos processos que levaram à formação dos cromossomos sexuais diferenciados Z e W. Dessa forma, a presença de RONs em cromossomos sexuais, ao menos nesse grupo, parece não ter relação com a determinação

do sexo, constituindo-se apenas em um importante marcador para algumas espécies (Alves, 2006).

Vicari *et al*. (2008), foram os primeiros a fazer a localização de DNAr no gênero, na espécie *C. gomesi*, na qual foram visualizados 10 sítios marcados com DNAr 18S, em contraste com as 7 marcações encontradas por Ag-RONs. Por outro lado, Noletto *et al*. (2009) encontraram em *C. lanei* um par marcado por FISH com sonda de DNAr 18S, coincidente com o par portador das RONs. Nesses dois trabalhos, foi aplicada também a FISH com sonda de DNAr 5S, sendo que ambos encontraram apenas um par portador dessas sequências.

Cromossomos supranumerários estão amplamente distribuídos na fauna e flora mundial. Eles já foram relatados em mais de 1.000 espécies de plantas (Jones e Rees, 1982), mais de 250 espécies de insetos (Jones e Rees, 1982) e, mais raramente, em roedores (Volobujev, 1980).

A ocorrência dessa classe de cromossomos em peixes não é um evento raro, pois sua existência já foi descrita para vários grupos. Esses cromossomos podem variar em relação ao tamanho, podendo ocorrer como microcromossomos, como no caso de *Prochilodus lineatus* (Pauls e Bertollo, 1983) e *Moenkhausia sanctafilomenae* (Foresti *et al.*, 1989); como cromossomos de tamanho médio, no caso de *Rhamdia hilarii* (Fenocchio e Bertollo, 1990; Garcia *et al*., 2010); e como macrocromossomos, no caso de algumas populações de *Astyanax scabripinnis* (Maistro *et al*., 1992; Maistro *et al*., 2001).

Apesar de diferentes mecanismos terem sido propostos para explicar a origem e manutenção dos cromossomos supranumerários em vários organismos, a heterocromatinização parece ser uma característica comum, ocorrendo durante a diferenciação desses cromossomos (Jones e Rees, 1982). Na maioria dos estudos, os cromossomos supranumerários apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Vicente *et al*., 1996). No entanto, já foram evidenciadas variações a esse padrão, com cromossomos dessa classe

totalmente eucromáticos sendo identificados em *Steindachnerina insculpta* (Oliveira e Foresti, 1993) e alguns cromossomos eucromáticos e outros heterocromáticos, como em *Moenkhausia sanctafilomenae* (Foresti *et al.*, 1989). Já em *Rhamdia hilarii* (Fenocchio e Bertollo, 1990), a heterocromatina foi observada somente nas regiões terminais de ambos os braços dos cromossomos supranumerários.

A presença de cromossomos supranumerários no gênero *Characidium* foi descrita em quatro espécies, *Characidium* cf. *zebra* , *C. gomesi*, *C. oiticicai* e *C. pterostictum* (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro, *et al.*, 1998, 2004; Alves *et al*., 2010). Esses cromossomos são pequenos, totalmente heterocromáticos, variando de 0 a 4 cromossomos em *C. gomesi* e *C. pterostictum*, de 0 a 3 em *C. oiticicai* e de 0 a 1 em *C.* cf. *zebra*.

A ocorrência de poliploidia (mais de dois conjuntos completos de cromossomos) natural em peixes Neotropicais está se tornando cada vez mais freqüente conforme o número de espécies e populações analisadas citogeneticamente aumenta. Todos os casos de poliplóides entre esses peixes estão relacionados a indivíduos triplóides, com nenhuma outra forma de poliploidia tendo sido descrita. No entanto, em *Curimata modesta* (Venere *et al*., 1985) e em *Astyanax scabripinnis* (Maistro *et al*., 1994), a triploidia é acompanhada de cromossomos supranumerários. No gênero *Characidium*, o único caso de triploidia natural está descrito para *C. gomesi*, um caso interessante de triploidia, uma vez que essa população apresenta cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW; nesse caso, a presença de um cromossomo W e dois cromossomos Z foi verificada, assim como três cromossomos portadores de RONs (Centofante *et al*., 2001).

Os dados disponíveis até o presente momento mostram uma grande diversidade cariotípica no gênero *Characidium*, apesar da constância do número diplóide e aponta uma carência de estudos que auxiliem na identificação das espécies desse grupo, uma vez que populações de uma mesma espécie apresentam características cariotípicas divergentes (por

exemplo, *C. gomesi*), o que faz desse gênero um alvo interessante para estudos citogenéticos clássicos e citogenético-moleculares mais aprofundados.

Além disso, apesar já haver alguma descrição citogenética para *C. lauroi*, *C. schubarti* e *C. oiticicai*, nenhuma discussão sobre a relação dos dados cariotípicos com a formação do grupo *C. lauroi* foi feita pelos autores (Centofante *et al*., 2003; Alves *et al*., 2010), o que enfatiza a necessidade de um estudo nesse sentido abrangendo as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi*.

1.5. Estudos Moleculares

Marcadores moleculares de DNA são utilizados como ferramenta para diversos estudos como, por exemplo, análises de variabilidade genética, fluxo gênico, identificação de espécies, entre outros. A utilização destes marcadores no estudo de populações naturais tem alcançado grande êxito no estabelecimento de relações genéticas e evolutivas dentro de um grupo, além de contribuir com estudos que visam à conservação de espécies (Wolfe e Liston, 1998).

A descoberta da utilidade do DNAmt como ferramenta molecular, no final da técnica de 70 (Avise *et al*., 1979a, b; Brown *et al*., 1979), produziu um grande impacto nos estudos moleculares de genética de populações e evolução. O DNAmt animal é composto por uma molécula circular pequena, fechada covalentemente, de tamanho variável (entre 15.000 a 17.000 pares de bases). Apresenta conteúdo gênico altamente conservado, representado por 37 genes, 24 deles envolvidos com o mecanismo de transcrição do próprio DNAmt (22 RNAts e dois RNArs) e 13 que codificam polipeptídios: três da Citocromo Oxidase c, sete da NADH desidrogenase, ATPase 6 e 8 e o complexo do Citocromo b (Ballard e Withlock, 2004). Há ainda uma região não codificante e altamente variável, o D-loop, que é a região

responsável pelo controle da duplicação do DNA mitocondrial (Figura 5) (Meyer, 1994; Johansen *et al*., 1990). Em algumas espécies de peixes, a organização do genoma mitocondrial apresenta diferenças, geralmente envolvendo genes de RNAt ou o tamanho da região D-loop (Miya *et al*., 2003; Mabuchi *et al*., 2004).

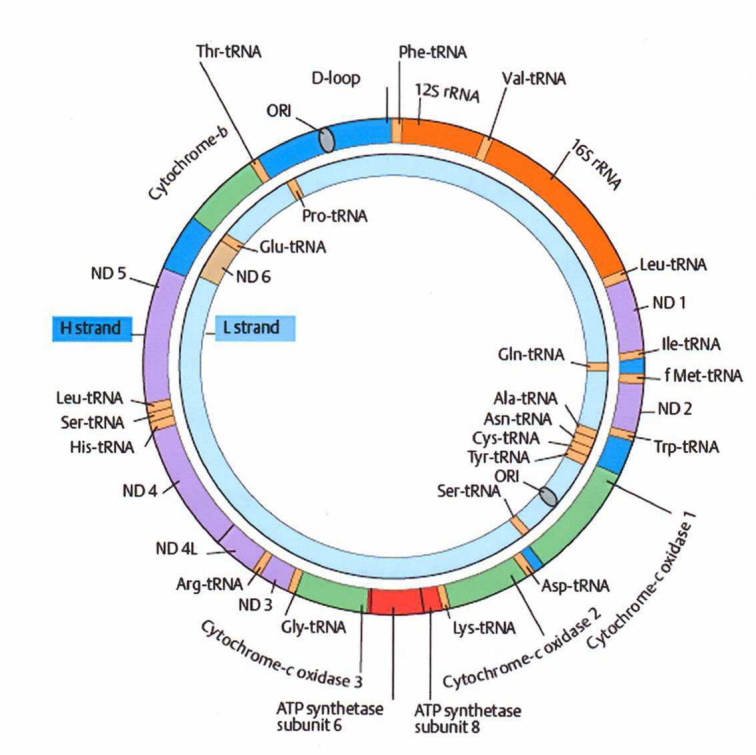


Figura 5: Esquema ilustrativo da organização do genoma mitocondrial em vertebrados (Fonte: Passarge, 1995).

Esse DNA apresenta algumas características que o tornam uma ferramenta adequada para estudos evolutivos, pois se trata de um genoma compacto, com estrutura e organização simples; ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis, com herança predominantemente materna e mendeliana; ausência de permutação; alta taxa de evolução quando comparada à taxa o DNA nuclear; e facilidade técnica de isolamento e extração, uma vez que a molécula de DNAmt está presente em alto número de cópias no genoma (Avise *et al*., 1987; Garesse *et al*., 1997).

O DNAmt apresenta uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, cerca de 5 a 10 vezes superior à do DNA nuclear (Brown *et al*., 1979; Harrison, 1989). Em primatas, essa taxa foi estimada em 2% de divergência de sequência por milhões de anos. Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que esse número pode variar entre diferentes regiões da molécula, entre diferentes táxons e até mesmo ao longo do tempo evolutivo em uma mesma linhagem (Avise, 1991; Strauss, 1999). Os peixes parecem apresentar uma taxa de substituição de nucleotídeos menor do que a dos vertebrados superiores (Kocher *et al*., 1989; Li, 1993; Martin e Palumbi, 1993).

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a alta taxa evolutiva do DNAmt, entre elas está a ineficiência dos mecanismos de reparo para corrigir mutações que surgem durante a replicação; o relaxamento da restrição de função e/ou da seleção; e a grande exposição do DNAmt a danos oxidativos.

Marcadores moleculares que utilizam o DNAmt são eficientes em análises intra e inter-específicas. Entre suas possíveis aplicações incluem-se: estimativas do grau de variabilidade genética (Avise, 1986; Moritz *et al.*, 1987); análise de zonas de contato (Szumura *et al.*, 1986) e de fluxo gênico (Sanetra e Crozier, 2003); estudos de biogeografia histórica (Bermingham e Avise, 1986; Beheregaray *et al.*, 2001); e caracterização de estrutura populacional (Liu *et al*., 2006), além do seu emprego crescente no campo da sistemática molecular, para a inferência de relações filogenéticas (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Ortí *et al.*, 1996; Calcagnotto *et al*., 2005, Pretti *et al*., 2009) e em estudos de conservação genética (Beheregaray *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005, Herbek *et al*., 2006).

A análise do DNAmt tem fornecido muitas informações úteis a respeito da diversidade genética, ao acrescentar uma perspectiva filogeográfica à demografia e à estrutura populacional de uma espécie (Avise *et al*., 1987). Nos peixes, o DNAmt tem sido bastante aplicado em estudos de relações genéticas tanto em populações naturais (Bermingham e

Martin, 1998; Moysés e Almeida-Toledo, 2002; Prioli *et al*., 2002; Montoya-Burgos, 2003; Moyer *et al*., 2004) quanto em populações cultivadas (Danzmann e Ihssen, 1995; Hansen *et al*., 2000; Hilsdorf *et al.*, 2002).

1.5.1. O uso de PCR-RFLP e de sequenciamento de DNA em peixes

Dentre as técnicas moleculares que utilizam o DNAmt, destacam-se os marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Lenght Polymorphisms – polimorfismos de tamanho em fragmentos de restrição*), que analisam os polimorfismos de comprimento dos fragmentos de DNA resultantes do tratamento com enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios específicos; e a técnica de sequenciamento do DNA, aplicados no estudo das relações filogenéticas e filogeográficas, utilizando a comparação entre as variações nas bases nitrogenadas em determinada posição da molécula de DNA.

A técnica de RFLP tem como princípio verificar a presença ou ausência de sequências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, que podem variar entre diferentes indivíduos, como resultado de polimorfismo nas sequências de DNA. Diferenças nos padrões podem ser resultantes de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição (Matioli, 2001). Essa técnica apresenta vantagens, pois o número de marcadores encontrados é praticamente ilimitado, além de possuir um baixo custo financeiro em comparação ao sequenciamento de todos os indivíduos de uma população, e de ser uma técnica rápida, onde não há necessidade de um conhecimento prévio da sequência do gene em estudo, além de permitir uma análise simultânea de muitos indivíduos (Matioli, 2001).

Uma modificação dessa técnica é a PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction based on restriction fragment length polymorphism* - *polimorfismos de tamanho em fragmentos de*

restrição baseado em reações em cadeia da polimerase), que pode ser utilizada em análises de estrutura genética e diversidade (Ohnaka *et al*., 1999; Ikeda e Taniguchi, 2002) e na identificação de espécies relacionadas (Osatomi *et al*., 2001). Em peixes, essa técnica já foi utilizada para estimar diversidade genética no gênero *Rinogobius* (Takahashi e Ohara, 2004), e na identificação e caracterização de espécies e de híbridos, bem como a identificação de haplótipos restritos a uma população (Agnese *et al.*, 1997; Urukawa *et al*., 1998; Triantafyllidis *et al*.,1999; Hold *et al*., 2001; Moisés e Almeida-Toledo, 2002; Aranishi *et al*., 2005; Garcez, 2005; Mohindra *et al*., 2007; Hashimoto *et al*., 2010).

A aplicação conjunta das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de genes pode fornecer informações sobre polimorfismos dentro da população. O sequenciamento de genes é uma metodologia dispendiosa, que não permite estudar todos os indivíduos. Através da PCR-RFLP, as diferenças dentro da população podem ser identificadas, direcionando assim, quais variantes devem participar do sequenciamento (Dowling *et al*., 1996).

Os dados de sequenciamento de DNA têm sido aplicados no estudo das relações filogenéticas, tendo como base as variações nas bases nitrogenadas em determinada posição da molécula de DNA. Em comparações interespecíficas, é comum trabalhar com caracteres que variem entre os grupos estudados, mas não dentro deles. Genes que possuem taxas de evolução altas e polimorfismos intraespecíficos de moderados a baixos são os mais adequados para a análise de relações evolutivas entre espécies próximas (Hillis *et al*., 1996). Em reconstruções filogenéticas, a escolha do gene a ser seqüenciado é crucial, já que árvores construídas para um mesmo grupo de organismos com base em conjuntos de dados diferentes podem resultar em filogenias diferentes. Desse modo, a escolha cuidadosa do gene é mais importante do que o método de reconstrução filogenética (Russo *et al*., 1996).

Apesar de ser amplamente utilizado em peixes, tanto o PCR-RFLP quanto o sequenciamento de genes ainda não foram aplicados com o intuito de resolver as relações

filogenéticas das espécies do gênero *Characidium*, o que ressalta a importância desses estudos no gênero. Somada a isso, a falta de resolução das relações filogenéticas das espécies do grupo *C. lauroi* reitera a necessidade da utilização dessas ferramentas no correto entendimento da história evolutiva desse grupo de espécies.

1.5.2. O uso do DNA *barcoding* em peixes

A identificação de espécies por meio da análise molecular tem sido utilizada por muitos anos. Inicialmente foram utilizadas as diferenças em izoenzimas (Avise, 1975), seguido da análise do DNAmt (Avise, 1994). Bartlett e Davidson (1991) foram os primeiros a usar o sequenciamento de DNA mitocondrial para identificação de peixes, mostrando que as sequências do Citocromo b poderiam discriminar quatro espécies de atum (*Thunnus* spp.). Posteriormente, eles propuseram a importância de sequências nucleotídicas como um meio de identificação para as espécies de peixes (Bartlett e Davidson, 1992). O sequenciamento de DNA para identificação de espécies, no entanto, é uma tarefa difícil, pois é necessário algum conhecimento prévio das espécies para se selecionarem os *primers* adequados para uma região gênica que caracteriza um táxon particular.

O uso do DNA *barcoding* difere do sequenciamento de uma região gênica arbitrária, por apresentar a proposta de uma única região gênica sendo usada como base de um sistema global de bioidentificação para os animais (Hebert *et al*., 2003). O gene mitocondrial Citocromo c oxidase 1 (COI) foi escolhido como o gene padrão para o DNA *barcoding* pois mostra uma sequência de aminoácido conservada que facilita o desenho de *primers* universais aplicáveis em um amplo grupo de animais (Hebert *et al*., 2003; 2004; Ward *et al*., 2005; Hajibabaei *et al*., 2006), e ficou estabelecido que o final 5’ deste gene mitocondrial é um alvo particularmente promissor para a identificação das espécies. O COI codifica parte da enzima

terminal da cadeia respiratória de mitocôndrias e variações específicas para esse gene são baixas quando comparadas entre indivíduos de uma mesma espécie. Por consequência, as espécies são definidas por uma sequência particular ou por um conjunto de sequências muito similares quando analisadas por meio dessa região gênica.

A eficácia do DNA *barcoding* para a identificação de espécies já foi validada para muitos grupos de animais (Waugh, 2007), de invertebrados a vertebrados (Hogg e Hebert, 2004; Hebert *et al*., 2004a,b; Hajibabaei *et al*., 2006a; Lefebure *et al*., 2006; Yoo *et al*., 2006; Elias *et al*., 2007; Costa *et al*., 2007; Clare *et al*., 2007). O uso dessa região gênica também ocorre para validar a identidade de linhagens de célula animal (Lorenz *et al*., 2005; Cooper *et al*. 2007) e é um passo recomendado para caracterização de materiais de repositórios de biodiversidade (Hanner e Gregory, 2007). Curiosamente, a mesma região gênica do COI tem se mostrado também eficaz para a identificação das espécies de algas vermelhas (Saunders, 2005), de protistas unicelulares (Chantangsi *et al*., 2007) e alguns fungos (Seifert *et al*., 2007).

Seu poder de discriminar espécies estreitamente relacionadas é largamente atribuível à abundância de mudanças sinônimas em seus nucleotídeos (Ward e Holmes, 2007).

No entanto, há muita controvérsia em relação ao uso do DNA *barcoding*. Essa controvérsia está relacionada à utilização de um gene mitocondrial para identificação de espécies, à sua capacidade de discriminar espécies recentemente irradiadas e espécies com extensa diferenciação espacial e à sua capacidade de descobrir novas espécies (Moritz e Cícero, 2004; Hickerson *et al*., 2006; Rubinoff *et al*., 2006). Há certamente problemas com alguns grupos específicos. Por exemplo, o COI evolui muito lentamente em determinados grupos de cnidários bentônicos (França e Hoover, 2002; Shearer *et al*., 2002) e, portanto, não possui resolução em nível de espécie para esse grupo (Hebert *et al*., 2003). Outra controvérsia relaciona-se com a escolha da região alvo (Erpenbeck *et al*., 2006), enquanto também têm sido sugerido o sequenciamento de uma parcela maior do gene COI (Roe e Sperling, 2007).

No entanto, a escolha de um marcador diferente causaria dificuldade de justificar essa sequência nova como *barcoding* (Neigel *et al*., 2007). Méier *et al*. (2006) observaram que as sequências de COI geraram apenas 70% de sucesso na identificação em nível de espécie em Díptera, usando sequências do GenBank. Porém, muitos registros nesse banco de dados são conhecidos como espécimes mal-identificados (Harris, 2003, Mitchell, 2008) e/ou com falta de referência para os espécimes utilizados (Ruedas *et al*., 2000; Pleijel *et al*., 2008). Novos testes, no entanto, têm mostrado recentemente que o COI proporciona uma resolução em nível de espécie em vários grupos de dípteros (Smith *et al*., 2006; Cywinska *et al*., 2006; Kumar *et al*., 2007; Carew *et al*., 2007; Ekrem *et al*. 2007).

A necessidade de uma ferramenta abrangente e confiável de identificação de espécies combinada com o sucesso precoce do DNA *barcoding* em peixes (Savolainen, 2005; Ward *et al*., 2005) provocou a formação *do Fish Barcode of Life Campaign* (FISH-BOL) (http://www.fishbol.org). Esta campanha tem como principal objetivo reunir registros de DNA *barcoding* para peixes de todo o mundo, cerca de 30 000 espécies. Dada a estimativa de US$ 200 bilhões para o valor anual da pesca mundial, o FISH-BOL está abordando questões sociais relevantes no que diz respeito ao mercado de pesca comercial, no âmbito da gestão das quotas e de substituição dos pescados. Além disso, o banco de dados está ajudando a conciliação de divergências em questões científicas, do mercado e nos nomes comuns entre as diferentes nações. Para ictiólogos, o FISH-BOL promete ser uma ferramenta poderosa para ampliar a compreensão da história natural e de interações ecológicas das espécies de peixes. Embora a saturação mutacional limite o valor das sequências do DNA *barcoding* para a resolução das relações em nível filogenético, os dados de *DNA barcoding* estão atualmente sendo incorporados em diversos projetos "*Tree of Life*". Na verdade, o uso do DNA *barcoding* é complementar aos estudos filogenéticos, pois lança luz sobre linhagens divergentes para posterior inclusão em tais análises (Hajibabaei *et al*., 2007). Portanto, os

dados gerados a partir de FISH-BOL contribuirão para uma síntese da história evolutiva do grupo mais diversificado de vertebrados na terra.

Com isso, devido à problemática na identificação das espécies do gênero *Characidium* apresentadas anteriormente, o uso de DNA *barcoding* é importante, pois pode auxiliar no processo de descrição de novas espécies, na separação de espécies pouco conhecidas, na sua correta identificação e, principalmente, no processo de validar a presença de um grupo de espécies relacionadas à espécie *Characidium lauroi*.

Objetivos

2. Objetivos

Com base no fato de o gênero *Characidium* ser ainda relativamente pouco estudado do ponto de vista citogenético e molecular, e no fato de poucos estudos nesse sentido terem sido realizados para o grupo *C. lauroi*, o objetivo do presente trabalho foi analisar citogeneticamente e molecularmente as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi*: *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. japuhybense*, *Characidium* sp. "iguaçu" e *Characidium* sp. "piabanha" provenientes de suas localidades-tipo, além de outras espécies do gênero, a fim de tentar elucidar as relações filogenéticas do grupo em questão, ampliar o conhecimento a respeito desse gênero e buscar marcadores citogenético-moleculares para as espécies.

Objetivos específicos:

- Estudar citogeneticamente os indivíduos coletados por meio das técnicas convencionais;
- Localizar sequências de DNAr 5S e 18S pela técnica de FISH, além de regiões CG-ricas do DNA;
- Identificar possíveis variações intra e inter populacionais por meio da técnica de PCR-RFLP e determinar as relações evolutivas das espécies do grupo *C. lauroi*;
- Utilizar as sequências de DNA *barcoding* para estabelecer os limites entre as espécies do grupo *C. lauroi*;
- Analisar as relações filogenéticas entre as espécies o gênero, com ênfase no grupo *C. lauroi*, por meio de sequenciamento de DNAmt, utilizando os genes ATPase 6 e 8 e Citocromo b.

Materiais e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Locais de coleta e espécies coletadas

No presente trabalho foram estudadas 20 populações do gênero *Characidium*, pertencentes a 10 espécies, como listado na Tabela 2, juntamente com seus pontos de coleta, quantidade de indivíduos coletados, código utilizado no texto e técnicas aplicadas. Na Figura 6, estão representadas as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi* e na Figura 7, as demais espécies coletadas.

Após as coletas, os espécimes foram encaminhados ao Laboratório de Ictiogenética da Universidade de São Paulo (USP-SP) e processados, recebendo posteriormente numeração correspondente aos registros do próprio laboratório. Após este processo, os exemplares foram armazenados em etanol 100%, posteriormente depositados e identificados no Museu Nacional do Rio de Janeiro – UFRJ pelo Prof. Dr. Paulo A. Buckup, com os números de tombo mostrados na Tabela 2. Os comprimentos padrões das espécies estudadas estão dispostos na Tabela 3.

A espécie *Characidium* cf. *zebra* foi utilizada em todas as abordagens por ser considerada basal dentro do gênero *Characidium* (Buckup, 1993b), enquanto que as espécies *C. oiticicai* e *Characidium* sp.2 não tiveram seus cariótipos descritos no presente trabalho, sendo utilizados apenas em técnicas moleculares.

A população de *Characidium* sp. “iguaçu” utilizada no presente trabalho não foi a mesma utilizada no trabalho que estabeleceu a atual conformação do grupo *C. lauroi* (Melo, 2001), pois durante a excursão de campo realizada para a captura dessa espécie, problemas relacionados ao nível do rio da localidade-tipo fizeram com que os coletores procurassem rios alternativos próximos, o que ocasionou a descrição de uma espécie nova pertencente ao grupo *C. lauroi*, aqui denominada de *Characidium* sp.2.

Tabela 2: Espécies estudadas, seus respectivos pontos de coleta e as técnicas aplicadas no presente trabalho.

Espécie	N° Amostral	Código	Rio	Bacia Hidrográfica	Município	GPS	N° Registro (MNRJ)	Citogenética	PCR-RFLP	DNA mitocondrial		
										ATPase 6 e 8	Cyt b	COI
Characidium sp.1	5♀		Rio dos Marins	Rio Paraíba do Sul	Piquete, SP	S: 22º 34.810’ W: 45º 07.901’	31497	X	X	X	X	X
C. lauroi	2?	rc1	Rio Papudos	Rio Paraíba do Sul	Rio Claro, RJ	S: 22º 48’ W: 45º 27’	36426	-	-	X	X	X
	2?	rc2	Rio das Pedras	Rio Paraíba do Sul	Rio Claro, RJ	S: 22º 52’ 41” W: 44º 13’ 35”	36508	-	-	X	X	X
	6 ♀ 5 ♂		Rio dos Marins	Rio Paraíba do Sul	Piquete, SP	S: 22º 34.810’ W: 45º 07.901’	36853	X	X	X	X	X
C. japuhybense	13 ♀ 2 ♂		Rio Japuíba	Sudeste/Rio Japuíba	Angra dos Reis, RJ	S: 22º 57.366' W: 44º 16.087'	33037	X	X	X	X	X
C. schubarti	21♀ 3♂	sma	Rio Taquaral	Rio Paranapanema	São Miguel Arcanjo, SP	S: 24º 02.803’ W: 48º 01.716’	33038	X	X	X	X	X
	20 ♀ 10 ♂		Rio Invernadinha	Rio Paranapanema	Jaguariaíva, PR	S: 24º 12.067’ W: 49º 37.657’	33041	X	X	X	X	X
	4 ♀ 6 ♂	p2	Rio Samambaias	Rio Paranapanema	Jaguariaíva, PR	S: 24º 13.764’ W: 49º 39.632’	33042	X	X	X	X	X
C. oiticicai	10 ♀ 5 ♂		Rio Piraitinga	Rio Tietê	Salesópolis, SP	S: 23º 32’ 59" W: 45º 41’ 37"	36856	-	X	X	X	X
C. sp. “piabanha”	14 ♀ 17 ♂		Ribeirão Santa Rita	Rio Paraíba do Sul	Teresópolis, RJ	S: 22º 18’ 56.8" W: 47º 01’ 18.7"	36863	X	X	X	X	X
Characidium sp.2	11 ♀ 4 ♂		Rio Campo Real	Rio Iguaçu	Guarapuava, PR	S: 25º 26’ 02.9" W: 51º 48’ 34.1"	36865	-	X	X	X	X
C. lanei	6 ♀ 2 ♂		-	Rio Ribeira do Iguape	Pariquera-açu, SP	S: 24º 43.483’ W: 47º 51.836’	33040	-	-	X	X	X
C. pterostictum	11 ♀ 3 ♂	pr	Rio Morato	Sudeste/Rio Guaraqueçaba	Guaraqueçaba, PR	S: 25º 11'04,4"/ W: 48º 17'57,3"	32952	-	-	X	X	X
	10 ♀ 4 ♂	cj	Rio Guaraú	Rio Ribeira do Iguape	Cajatí, SP	S: 24º 46’ 50.3" W: 48º 05’ 19.8"	36858	-	-	X	X	X
	5♀ 7♂		Rio Betari	Rio Ribeira do Iguape	Iporanga, SP	S: 24º 33.026’ W: 48º 40.875’	-	-	-	X	X	X

Tabela 2: Espécies estudadas, seus respectivos pontos de coleta e as técnicas aplicadas (**continuação**).

Espécie	N° Amostral	Código	Rio	Bacia Hidrográfica	Município	GPS	N° Registro (MNRJ)	Citogenética	PCR-RFLP	DNA mitocondrial		
										ATPase 6 e 8	Cyt b	COI
Characidium cf. *zebra*	3 ♀		Córrego do Tomaizinho	Rio Grande	Cardoso, SP	S: 20º 04.905' W: 49º 55.373'	31498	-	-	X	X	-
	3 ♀		Córrego do Baguaçú	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga, SP	S: 21º 54.694'/ W: 47º 20.234'	33036	-	-	X	X	-
	25 ♀ 18 ♂	p5	Rio Passa-Cinco	Rio Piracicaba - Rio Tietê	Ipeúna, SP	S: 22º 25.845' W: 47º 41.786'	36849	X	X	X	X	X
	11 ♀ 12 ♂		Rio Água Branca	Rio Sorobaca - Rio Tietê	Iperó, SP	S: 23º 24' 56.4" W: 47º 46' 30.5"	36854	-	-	X	X	-
	2 ♀ 1 ♂		Ribeirão do Pântano	Rio Mogi-Guaçu	Descalvado, SP	S: 21º 44' 34.1" W: 47º 40' 13.7"	36860	-	-	X	X	-

Legenda: X = estudo realizado; - = ausência de dados.

Tabela 3: Comprimento padrão médio das espécies do gênero *Characidium* estudadas no presente trabalho (Fonte: *FishBase;* Melo, 2001).

Espécie	Comprimento padrão (média em mm)
C. lauroi	61,2
C. japuhybense	52,7
C. oiticicai	34,4
C. schubarti	50,3
Characidium sp. "iguaçu"	36,1
Characidium sp. "piabanha"	45,6
Characidium cf. *zebra*	62,0
C. pterostictum	41,0
C. lanei	65,0

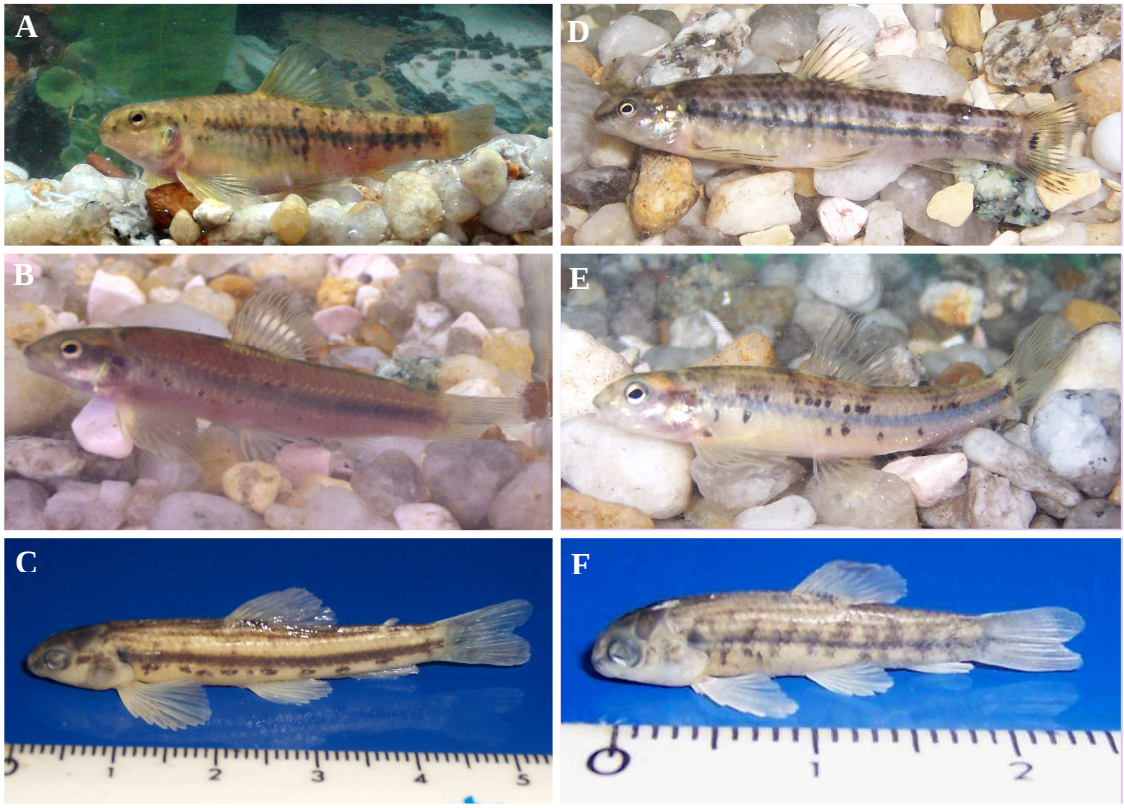


Figura 6: Espécies do gênero *Characidium* coletadas pertencente ao grupo *C. lauroi*. **A** – *C. lauroi*; **B** – *C. japuhybense*; **C** – *C. oiticicai*; **D** – *C. schubarti* (sma); **E** – *Characidium* sp. "piabanha"; **F** – *Characidium* sp.2

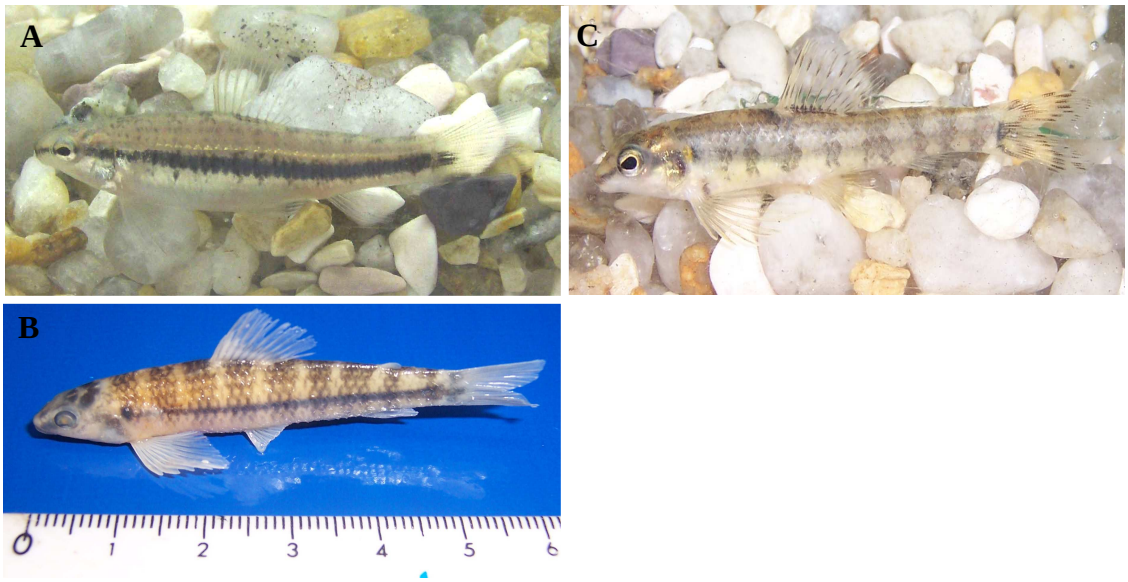


Figura 7: Espécies do gênero *Characidium* coletadas não pertencentes ao grupo "*lauroi*": **A** – *C. lanei*; **B** – *C. pterostictum*; **C** – *Characidium* cf. *zebra*.

3.2. Procedimentos metodológicos citogenéticos

3.2.1. Estimulação de Mitoses

A técnica de estimulação de divisão celular foi utilizada em algumas preparações cromossômicas, para obtenção de maior número de mitoses, por injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Levan (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980), para pequenos mamíferos e por Lozano *et al.* (1988) e Oliveira *et al.* (1988) para peixes. O procedimento utilizado consiste em:

1) Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
2) Incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
3) Injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, divididas e aplicadas no período de 48 h;
4) Manter o animal em aquário bem aerado.

3.2.2. Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro* foi a descrita por Gold *et al.* (1990) e utilizada com algumas modificações. O procedimento consiste em:

1) Sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 ml de uma solução modificada de Hanks (ou meio 1640 ou TC 199, com ou sem soro fetal bovino);
2) Dissociar o material com o auxílio de uma pinça de dissecção e de uma seringa de vidro desprovida e agulha;
3) Adicionar de uma a quatro gotas de colchicina a 0,02% ;
4) Incubar em estufa a 37ºC por cerca de 25 min;
5) Ressuspender o material, utilizando uma pipeta de Pasteur, e centrifugá-lo por 10 min, a 900 rpm;
6) Remover o sobrenadante e acrescentar solução hipotônica de KCL a 0,075M (10-12 ml);
7) Ressuspender o material e incubá-lo por aproximadamente 25 mim em estufa 37ºC;
8) Adicionar cerca de 1 ml de fixador (metanol e ácido acético, na proporção de 3:1, respectivamente), agitar a mistura e levar à centrífuga por 10 min a 900 rpm;
9) Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador e centrifugar por 10 min a 900 rpm;
10) Repetir o item 9 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
11) Pingar o material em lâminas;
12) Deixar secar ao ar.

3.2.3. Técnica de identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

A detecção das regiões organizadoras de nucléolo pode ser obtida por meio da técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RONs), descrita por Howell e Black (1980). O procedimento consiste em:

1) Colocar sobre as preparações cromossômicas uma gota de solução de gelatina (2%) e duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%);
2) Misturar levemente com a ponta de uma lamínula, tomando cuidado para não riscar o material;
3) Cobrir a lâmina com uma lamínula;
4) Manter a lâmina em estufa a 60ºC o tempo necessário para que os cromossomos e núcleos assumam uma coloração amarelada e os nucléolos a as RONs, numa coloração quase preta (tempo estimado entre 3 e 5 min);
5) Remover a lamínula com um jato de água destilada, lavando bem o material;
6) Corar as lâminas com solução de Giemsa a 5% por 10 segundos;
7) Deixar secar ao ar e analisar a preparação em microscópio.

3.2.4. Técnica de obtenção de Regiões de Heterocromatina Constitutiva (Banda C)

A detecção das regiões de heterocromatina constitutiva pode ser feita por meio da técnica descrita por Sumner (1972). O procedimento consiste em:

1) Hidrolisar as lâminas por 30 min em HCL 0,2N à temperatura ambiente. Lavar em água destilada;
2) Passar por uma solução de $Ba(OH)_2$ a 60ºC, por aproximadamente 5 a 15 segundos. Lavar em água destilada;
3) Lavar em HCL 1N a 60ºC. Lavar em água destilada;
4) Incubar por 30 min em 2xSSC (pH=6,8), a 60ºC;
5) Corar por aproximadamente 30 min com Giemsa 5% em tampão fosfato (ph=6,7);
6) Lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

3.2.5. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 18S

A aplicação da técnica deu-se segundo protocolo Pinkel *et al* (1964), utilizando para detecção dos sítios ribossomais as sondas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e DNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

Marcação da Sonda de DNA:

Com Biotina (Kit Bionick Labeling System – Invitrogen):

1) Pipetar em um tubo de 1,5 mL no gelo (caso use termociclador, use tubo de 0,2 mL):
   - Adicionar 5 µL de dNTP mix 10x;
   - Adicionar ___ µL (1 µg) de DNA;
   - Adicionar ___ µL de água destilada (q.s.p. 45 µL);
   - Adicionar 5 µL de Enzima mix 10x.
2) Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g);

3) Incubar a 16ºC por uma hora (para sondas pequenas, o tempo de incubação pode ser de até duas horas);
4) Adicionar 5 µL de Stop Buffer;
5) Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (5 µL) e etanol absoluto gelado (110 µL). Misturar invertendo o tubo. Levar a freezer -20ºC por duas horas ou overnight;
6) Centrifugar a 15000g por 10 minutos;
7) Cuidadosamente, remover o sobrenadante e secar o pellet;
8) Ressuspender o pellet em 50 µL de água destilada;
9) Repetir os passos 5 e 6;
10) Ressuspender em 80 µL de TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) – 1 mM EDTA) e armazenar a -20ºC. Caso a sonda seja utilizada no mesmo dia, pode-se usar água destilada (do próprio kit).

Preparação das lâminas:

Tratamento com RNAse

1) Incubar as lâminas em 90 µL de RNAse 0,4% em 2xSSC, por uma hora, em câmara úmida a 37ºC;
2) Lavar três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada;
3) Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

Pós-fixação

1) Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50nM de cloreto de magnésio durante 10 minutos, em temperatura ambiente;
2) Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente;

3) Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada.

Pré-hibridação

1) Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70ºC;
2) Desidratar o material em série alcoólica com etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada;
3) Deixar secar ao ar, enquanto se prepara a solução de hibridação.

Solução de Hibridação

1) Adicionar aos 80 µL de sonda marcada;
2) 200 µL de formamida pura;
3) 80 µL de sulfato dextrano 50% (concentração final 10%);
4) 40 µL de 20xSSC.

Hibridação

1) Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;
2) Colocar 40 µL da solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina seca sobre a lamínula;
3) Deixar as lâminas com material voltado para baixo em câmara úmida a 37ºC overnight.

Lavagens

1) Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos, apenas para soltar as lamínulas;
2) Lavar duas vezes em formamida 20% em 0,1xSSC a 42ºC, durante 5 minutos cada;

3) Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42ºC durante 5 minutos cada;
4) Lavar uma vez em 2xSSC a 42ºC durante 5 minutos;
5) Lavar em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

Detecção do Sinal

1) Incubar as lâminas em tampão NFDM por 15 minutos;
2) Lavar duas vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
3) Incubar as lâminas com 90 µL de solução de FITC-avidina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
4) Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
5) Incubar as lâminas com 90 µL de solução de antiavidina conjugada com biotina (preparada 30 minutos antes), durante 30 minutos em câmara úmida escura, em temperatura ambiente;
6) Repetir passo 4 (lavagem);
7) Repetir passo 3 (FITC-avidina);
8) Repetir passo 4 (lavagem);
9) Repetir passo 5 (antiavidina);
10) Repetir passo 4 (lavagem);
11) Repetir passo 3 (FITC-avidina);
12) Repetir passo 4 (lavagem);
13) Desidratar as lâminas em série alcoólica de etanol 70% (sob agitação), 85% e 100%, por 5 minutos cada, e deixar secar ao ar.

Montagem das lâminas

1) Monte as lâminas com solução de iodeto de propídio e antifade, na proporção de 200 µL de antifade para 8 µL de PI a 50 µg/mL, com lamínula longa (60 x 24 mm).
2) Guardar as lâminas montadas numa caixa escura, em geladeira, por pelo menos um dia antes da análise em microscópio de epifluorescência.

3.2.6. Coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina A_3

A coloração com Cromomicina A_3 seguiu o protocolo descrito por Schmid (1980), como se segue:

1) Sobre uma lâmina, preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, colocar cerca de 50 µL de solução de distamicina, 0,3mg/mL;
2) Cobrir com uma lamínula e deixar agindo por 20 minutos. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em água destilada ou água corrente rapidamente e deixar secar ao ar;
3) Colocar 50 µL da solução de cromomicina A_3, cobri-la novamente com uma lamínula e deixar corando por 30 minutos no escuro. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em água destilada ou água corrente rapidamente e deixar secar ao ar;
4) Montar a lâmina com 100 µL de sacarose saturada;
5) Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la.

3.2.7. Captura de Imagens

As preparações foram analisadas em microscópio de luz ou microscópio de epifluorescência e capturadas com 5 Mp de definição por meio do sistema de análise de

imagens CoolSnap Pro, utilizando-se para tal o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics).

3.2.8. Montagem dos cariótipos

Os cariótipos foram montados com base na classificação cromossômica proposta por Levan *et al*. (1964). As imagens foram recortadas e montadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS2.

3.3. Procedimentos metodológicos moleculares

3.3.1. Extração salina de DNA

A técnica de extração salina de DNA utilizada seguiu o protocolo proposto por Aljanabi and Martinez (1997), descrito abaixo:

1) Retirar uma amostra de fígado em eppendorf estéril. Deixar secar em estufa a 37ºC até perder o cheiro de álcool (5 a 10 min);
2) Homogeneizar bem a amostra com auxílio de uma tesoura ou pinça em 400 µl de tampão salino;
3) Adicionar 40 µl de SDS 20% (concentração final 2%) e de 5 a 8 µl de proteinase K. Misturar bem;
4) Incubar por cerca de 1 hora a 65ºC ou overninght;
5) Esperar a amostra atingir a temperatura ambiente e adicionar 10 µl de RNAse e deixar cerca de 1 hora a 37ºC;

6) Adicionar 300 µl de NaCl 6M e vortexar em alta velocidade por cerca de 1 minuto;
7) Centrifugar a 10.000G por 30min;
8) Transferir o sobrenadante para eppendorf estéril;
9) Adicionar 600 µl de isopropanol e misturar bem vertendo o tubo delicadamente;
10) Incubar a -20ºC por 1 hora;
11) Centrifugar 20 minutos a 10.000G (4ºC);
12) Descartar o sobrenadante e lavar o pellet em 600 µl de etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000G (4ºC);
13) Secar o pellet em estufa até perder o cheiro de álcool ou deixar à temperatura ambiente overninght;
14) Adicionar 50 µl de TE ou água estéril. Deixar as amostras 24h a 4ºC. Armazenar em freezer.

3.3.2. Amplificação dos genes mitocondriais

Para a amplificação das regiões mitocondriais foram realizadas reações de PCR, utilizando os seguintes pares de primers:

- ATPase 6 e 8: ATP8.2-L8331 (5' – AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC – 3') e CO3.2- H9236 (5' – GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C – 3') (Sivasundar et *al*., 2001), que amplificam um segmento de aproximadamente 950 pb, correspondente às sequências integrais das subunidades 6 e 8 do gene

da ATPase e à sequência parcial da subunidade 3 do gene da citocromo-oxidase (CO3);

- Citocromo b: GluDG.L (5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3') + H16460 (5'-CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G-3') (Perdices *et al*., 2002) que ancoram nas regiões flanqueadoras dos genes de tRNA da glutamina e treonina, amplificando cerca de 1000pb da sequência do gene do Citocromo b;
- COI: VF1_t1 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G) + VR1_t1 (CAG GAA ACA GCT ATG ACT AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA ATC A) (Ivanova et al., 2006) que amplificam um segmento de aproximadamente 700 pb da sub unidade 2 do Citocromo c oxidase 1.

Cada reação de PCR apresentou o volume final de 25 µl, contendo:

- 1,00 µl de DNA molde [20ng/mL];
- 1,00 µl de cada primer [10pM];
- 1,50 µl de $MgCl_2$ [25mM];
- 2,50 µl de tampão [10x];
- 2,50 µl de dNTP [10m M];
- 0,25 µl [5U] de Taq polimerase – Fermentas;
- 15,25 µl de água destilada.

As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research e as condições da PCR foram as seguintes: 94ºC (4

min), 10 ciclos de 92°C (0,5 min), 53°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), 40 ciclos de 92°C (0,5 min), 56°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), seguidos de um período de extensão final de 10 min a 72°C e um período de resfriamento a 4°C.

A verificação de amplificação foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, com 4,0 µl de amostra, mais 1,0 µl de azul de bromofenol, com ladder de 1 kb para verificação do tamanho do fragmento amplificado, e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak).

3.3.3. Técnica de PCR-RFLP

As digestões com enzimas de restrição foram preparadas com volume final de 10,0 µl, para o gene mitocondrial ATPase 6 e 8, como segue:

- 3,0 µl do produto da amplificação;
- 1,0 µl de tampão apropriado;
- 0,3 µl de enzima;
- 5,7 µl de água destilada.

As enzimas utilizadas foram as seguintes: *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Mbo* I e *Rsa* I; os sítios de corte estão relacionados na Tabela 3. Os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo, com os 10,0 µl da reação de digestão, mais 1,0 µl de azul de bromofenol, com ladder de 50 pb para verificação dos tamanhos do fragmentos digeridos. Os géis foram visualizados

em transluminador de luz ultravioleta, fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak).

Cada padrão dos polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição obtido para cada enzima foi nomeado com uma letra, sendo que cada haplótipo apresenta um conjunto de letras baseado nas enzimas de restrição.

Tabela 4: Relação dos sítios e corte das enzimas utilizadas na técnica de PCR-RFLP

Enzima de Restrição	Sítios de corte (5' – 3')
Alu I	AG/CT
Hae III	GG/CC
Hind III	A/AGCTT
Hinf I	G/ANTC
Hpa II	C/CGG
Mbo I	/GATC
Rsa I	GT/AC

Com base nos padrões de digestão obtidos foram construídos mapas de restrição para cada haplótipo e uma matriz de presença/ausência de sítio de corte foi gerada a partir dos padrões de restrição encontrados. Utilizando a matriz obtida, foram calculados os valores de diversidade e divergência nucleotídica observados entre as populações e espécies. Também foram calculados os valores de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica dentro das amostras, segundo o modelo de Nei e Tajima (1981) utilizando o programa REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) (McElroy et al., 1992). Com esses dados, foi construído um fenograma de Evolução Mínima

utilizando o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007) para a determinação das relações entre as espécies e populações estudadas.

3.3.4. Reação de sequenciamento e precipitação

Para realização da reação de sequenciamento utilizou-se o kit "BigDye Sequence Terminator v.3.1" (Applied Biosystems). As seguintes condições foram utilizadas para a reação:

- 1,0 µl da reação de PCR;
- 2µl Sequencing Buffer;
- 0,5µl de primer [10pM];
- 5,5 µl de água destilada;
- 1µl BigDye® Terminator v3.1.

As condições de amplificação foram às seguintes: 25 ciclos a 96ºC por 30 segundos; 15 segundos a 50ºC; 4 minutos a 60ºC. Após término do ciclo de Big Dye, os produtos foram precipitados, utilizando-se o seguinte protocolo:

- Adicionar os 80 µl do mix (3µl de acetato de sódio 3M pH 5,5; 62,5 µl de etanol absoluto; 14,5 µl de água destilada) por tubo de reação;
- Homogeneizar cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e deixar os tubos no escuro por no mínimo 15 minutos;
- Centrifugar por 20 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta;

- Adicionar 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente;
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta e deixar os tubos durante 3 minutos a 95ºC (com a tampa aberta) para evaporação do álcool;
- Manter a -20ºC até o momento da aplicação das amostras no seqüenciador.

As amostras foram seqüenciadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.3.5. Obtenção e análise das sequências

Após a realização do sequenciamento, dois tipos de arquivos foram obtidos, um contendo a sequência propriamente dita, e um contendo o eletroferograma (representação gráfica do sinal cromatográfico gerado pela passagem de cada nucleotídeo pelo detector do seqüenciador). As sequências foram visualizadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAmt, fez-se uso do programa Gene Runner v.3.05. Todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al*., 1994) pelo programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*.,2007) aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2). Para verificação do alinhamento, foi visualizado o quadro de leitura das sequências por meio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007), uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros. As sequências foram verificadas no GenBank

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov) por meio do programa “BlastN”, que investiga a similaridade destas com sequências de DNAmt de outros peixes.

Para verificação da ocorrência de saturação nos genes foi utilizado o programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que possibilitou a construção de gráficos que demonstram a quantidade de transições (TS) e trasnversões (TV) com relação à distância genética entre os táxons.

3.3.6. Análises filogenéticas

Para as análises das relações evolutivas, foram escolhidos dois indivíduos de cada população. Como grupo externo, foi escolhida a espécie *Astyanax mexicanus*, cujas sequências foram retiradas do GenBank, com número de acesso AF287358, para o gene ATPase (Machordom e Doadrio, 2001), FJ439346, para o gene citocromo B (Ornelas-Garcia *et al*., 2008) e EU751661, para o gene COI (Valdez-Moreno et al., 2009).

As análises filogenéticas foram realizadas, inicialmente, com as regiões gênicas separadas, e em seguida, com as sequências concatenadas. Para a construção de dendrogramas com base no algoritmo de agrupamento de vizinhos “Neighbor Joining”-NJ (Saitou e Nei, 1987) foi utilizado o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007) com o modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) que considera as diferenças entre as taxas de transição e transversões, assim como as diferenças quanto ao conteúdo de bases CG. Testes de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) de 1000 replicações foram efetuados para a árvore NJ construída, sendo que os valores inferiores a 50% foram desconsiderados.

As análises baseadas no método de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com algoritmo “tree bisection and

reconnection" (TBR), sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram considerados como dados ausentes. Foram calculados os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência rescalonado (CR) por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). O programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999) foi empregado para a obtenção do índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994). A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado foi realizada pelo programa MODELTEST 3.0 e este foi utilizado para estimar a distância genética entre os grupos estudados (Posada e Crandall, 1998). Para a determinação dos valores de *bootstrap* foram utilizadas 1000 replicações, respectivamente, com retenção de grupos com freqüência maior que 50%.

Para as análises do COI, árvores de "Neighbor Joining"- NJ (Saitou e Nei, 1987) por meio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007) com o modelo Kimura -2-parâmetros (Kimura, 1980) foram criadas para prover uma representação gráfica do padrão de divergência entre as espécies, com o Teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizando 10.000 réplicas.

Em todas as análises, os valores de *bootstrap* entre 50-70 foram considerados fracos, entre 70-90 bons e iguais ou superiores a 90, fortes.

Capítulo 1

Capítulo 1

Aplicação de marcadores citogenéticos e de PCR-RFLP na caracterização genética do grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae.

Palavras-chave: grupo *Characidium lauroi*, citogenética, enzima de restrição, haplótipos conjugados, PCR-RFLP.

Resumo

Dentro do gênero *Characidium*, o grupo *Characidium lauroi* destaca-se por ser um grupo de espécies à qual os estudos citogenéticos não foram aplicados com o intuito de verificar a existência do grupo e sua evolução cariotípica, da mesma forma que nenhum estudo molecular foi aplicado. Esse grupo de espécies é composto por *C. lauroi*, *C. japuhybense*, *C. oiticicai*, *C. schubarti*, *Characidium* sp. "piabanha" e *Characidium* sp. "iguaçu", e as relações evolutivas entre essas, baseado em caracteres morfológicos, não foram ainda totalmente elucidadas. No presente estudo, técnicas de citogenética clássica e molecular, e a técnica de PCR-RFLP foram utilizadas na tentativa de elucidar essas relações. Os resultados encontrados, tanto citogenéticos, quanto moleculares, indicam que esse grupo de espécies pode ser definido por essas características e considerações sobre a relação entre os resultados encontrados e os dados da literatura para o gênero *Characidium* são discutidas.

Abstract

Inside the genre *Characidium*, the group *Characidium lauroi* stands out for being a group of species in which cytogenetic studies were not applied in order to verify the existence of the group and its karyotype evolution, in the same way that no molecular study has been applied. This species group consists of *C. lauroi*, *C. japuhybense*, *C. oiticicai*, *C. schubarti*, *Characidium* sp. “piabanha” and *Characidium* sp. “iguaçu”, and the evolutionary relationships between them, based on morphological characters, have not yet been fully elucidated. In this study, techniques of classical and molecular cytogenetics and PCR-RFLP were used in an attempt to elucidate these relationships. The results, both cytogenetics and molecular, indicate that this group of species can be defined by those features and considerations about the relationship between our results and literature data for the genus *Characidium* are discussed.

Introdução

Os peixes da família Crenuchidae estão presentes na maioria das drenagens de água doce da região Neotropical, localizadas entre o leste do Panamá e o leste da Argentina (Buckup, 1993b). Esses peixes raramente ultrapassam 10 cm de comprimento padrão e a maioria deles habita pequenos córregos de escoamento rápido, onde freqüentemente gravitam ao redor de fendas, rochas e vegetação (Buckup, 1993b). No entanto, a maior parte da diversidade da família está estrita às drenagens do Rio Orinoco e do Rio Amazonas, que abrigam a maioria dos gêneros descritos para a família, com exceção do gênero *Characidium*, que constitui o táxon mais amplamente distribuído e rico em número de espécies (Buckup, 1993a, 2003; Nelson, 2006).

Nos últimos anos, a relação de proximidade entre algumas espécies do gênero tem sido reportada com base em seus caracteres morfológicos (Travassos, 1967; Buckup e Reis, 1997; Buckup e Hahn, 2000; Melo e Buckup, 2002). Com relação a essas descrições, destaca-se o "grupo *Characidium lauroi*" (Travassos, 1967; Melo, 2001;), composto por seis espécies (*C. lauroi*, *C. japuhybense*, *C. oiticicai*, *C. schubarti*, *Characidium* sp. "iguaçu" e *Characidium* sp. "piabanha"), cuja distribuição geográfica está restrita às cabeceiras das bacias do Rio Paraíba do Sul, Rio Tietê, Rio Iguaçu, Rio Paranapanema e Drenagens costeiras do Estado do Rio de Janeiro (Melo, 2001). No entanto, as relações filogenéticas dentro desse grupo não foram ainda totalmente esclarecidas. Melo (2001) propôs as possíveis relações evolutivas dentro do grupo com base em caracteres morfológicos. A topologia obtida por esse autor permitiu demonstrar a existência de uma relação de proximidade entre as espécies do grupo *C. lauroi*, além de uma congruência entre as relações dos terminais obtidos com a sua distribuição geográfica. Entretanto, não foi possível resolver as relações entre todas as espécies

estudadas, como pode ser visto na Figura 3 (introdução). O estudo de Melo (2001) foi uma das primeiras tentativas de se estabelecer um parentesco entre as espécies do grupo *C. lauroi*, porém estudos biológicos de outra natureza ainda não foram efetuados com este mesmo enfoque.

Várias espécies do gênero *Characidium* já foram analisadas por meio de técnicas citogenéticas, incluindo algumas espécies do grupo *C. lauroi* (Centofante *et al*., 2003; Alves *et al*., 2010), porém esses estudos apresentam apenas um enfoque descritivo, sem que os autores relacionassem as características citogenéticas encontradas com a formação desse grupo de espécies.

Estudos de biologia molecular também não foram ainda aplicados às espécies do grupo *C. lauroi*. Entre as técnicas de biologia molecular, pode-se destacar a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism*) por ser uma técnica rápida e que permite a análise simultânea de muitos indivíduos, além de ter um baixo custo financeiro quando comparada com as técnicas que envolvam o sequenciamento de DNA (Matioli, 2001). Essa técnica é muito utilizada para a identificação de espécies e de suas relações (Agnese *et al.*, 1997; Urukawa *et al*., 1998; Triantafyllidis *et al.*, 1999; Osatomi *et al*., 2001; Hold *et al*., 2001; Moisés e Almeida-Toledo, 2002; Aranishi *et al*., 2005; Garcez, 2005; Mohindra *et al*., 2007).

Na tentativa de elucidar as relações evolutivas das espécies do grupo *C. lauroi* não resolvidas com base em estudos morfológicos (Melo, 2001), o presente trabalho tem por objetivo utilizar as técnicas de citogenética e de PCR-RFLP nas espécies pertencentes ao grupo *Characidium lauroi*.

Materiais e Métodos

Foram analisadas no presente trabalho as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi* (*C. lauroi, C. japuhybense, C. oiticicai, C. schubarti*, *Characidium* sp.2 e *Characidium* sp. "piabanha") por meio de técnicas citogenéticas e moleculares, sendo a espécie *Characidium* cf. *zebra* usada como grupo externo. As localidades, número de tombo e populações utilizadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 2 (materiais e métodos).

As análises citogenéticas foram efetuadas em todos os indivíduos amostrados da população, com exceção de *C. oiticicai* e *Characidium* sp.2, que apresentaram dificuldades na aplicação das técnicas. Para as análises de PCR-RFLP, 30 indivíduos de cada população foram utilizados, sempre que possível.

Nas análises citogenéticas foram utilizadas as técnicas de estimulação de mitose em peixes (Oliveira *et al.*,1988). Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim por meio da técnica adaptada por Gold *et al*. (1990) para o estudo em peixes. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al*. (1964). Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por meio da impregnação por nitrato de prata utilizou-se a técnica descrita por Howell e Black (1980). O procedimento de coloração cromossômica por fluorocromos GC-específicos deu-se segundo Schmid (1980), com algumas modificações, utilizando Cromomicina A_3 (CMA_3). Para evidenciar os blocos de heterocromatina constitutiva aplicou-se a técnica descrita por Sumner (1972), sendo que o tempo de exposição aos reagentes foi adaptado ao material em estudo. A localização direta de cístrons ribossômicos foi realizada por meio da técnica de hibridação *in situ*

fluorescente (FISH) (Pinkel *et al*., 1986) utilizando sondas específicas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de DNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

Para a análise de PCR-RFLP, amostras de tecido (fígado, músculo ou nadadeira), preservadas em etanol absoluto foram utilizadas para a extração de DNA genômico total seguindo o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez, 1997). Para a amplificação da região mitocondrial ATPase 6 e 8 utilizada no presente trabalho, foram efetuadas reações de PCR, utilizando o par de primers ATP8.2-L8331 (5' – AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC – 3') e CO3.2- H9236 (5' – GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C – 3') (Sivasundar *et al*., 2001). As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research e as condições da PCR foram as seguintes: 94ºC (4 min), 10 ciclos de 92°C (0,5 min), 53°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), 40 ciclos de 92°C (0,5 min), 56°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), seguidos de um período de extensão final de 10 min a 72°C e um período de resfriamento a 4°C.

As digestões com enzimas de restrição foram preparadas com volume final de 10 µl, contendo 3,0 µl do produto da amplificação, 1 µl de tampão apropriado, 0.3 µl de enzima e 5.70 µl de água destilada. As enzimas utilizadas foram *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Mbo* I e *Rsa* I. Os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, com os 10 µl da reação de digestão, mais 1 µl de azul de bromofenol, com ladder de 50 pb para verificação dos tamanhos do fragmentos digeridos. Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta, fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak). Cada um dos diferentes padrões de restrição obtidos para cada enzima foi nomeado com uma letra maiúscula e os haplótipos conjugados foram caracterizados por um conjunto de letras.

Com base nos padrões de digestão obtidos, foram construídos mapas de restrição para cada haplótipo e uma matriz de presença/ausência de sítio de corte foi gerada a partir dos padrões de restrição encontrados. Utilizando a matriz obtida, foi calculado o valor de diversidade nucleotídica entre as populações, segundo o modelo de Nei e Tajima (1981) utilizando o programa REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) (McElroy *et al*., 1992). Com esses dados, foi construído um fenograma de UPGMA utilizado o programa MEGA 4.0 (KUMAR *et al*., 2007) para a determinação das relações evolutivas entre as espécies e populações estudadas.

Resultados

Todas as espécies analisadas citogeneticamente no presente trabalho apresentaram 2n = 50 cromossomos, com a mesma composição cariotípica, de 32m + 18sm, para machos, e 31m + 19sm, para fêmeas (Figuras de 8 a 15). Essa variação associada ao sexo caracteriza o sistema de cromossomos sexuais diferenciados ZZ/ZW, por ser a fêmea o sexo heterogamético. O cromossomo Z apresentou-se como um cromossomo metacêntrico, enquanto que o W como um cromossomo submetacêntrico. O cromossomo W apresentou algumas diferenças morfológicas relacionadas ao tamanho entre as espécies, sendo que em *Characidium* sp. “piabanha”, o W foi maior que o cromossomo Z (Figura 9**c**, **g**), o que não ocorre nas demais espécies estudadas no presente trabalho. Em relação à posição do par sexual no cariótipo das espécies, essa foi variável, mas localizadas sempre nos primeiros pares do complemento (Figuras de 8 a 15).

Para a espécie *C. lauroi*, cujo estudo levou à realização de duas viagens de campo para a mesma localidade, foi possível identificar a presença de duas populações

simpátricas, citogeneticamente distintas, porém, morfologicamente semelhantes. A distinção entre elas foi possível pelo fato de que a primeira população coletada apresentou as RONs localizadas no primeiro par de cromossomos submetacêntricos e pela ausência de cromossomos sexuais diferenciados, sendo chamada de *Characidium* sp.1 (Figura 14). Já a segunda população apresentou as RONs localizadas nos cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW, que corresponde ao cariótipo de *C. lauroi* (Figura 8).

Nos cariótipos de *Characidium* sp.1 (Figura 14) e de *Characidium* cf. *zebra* (Figura 15), não foram identificados cromossomos sexuais diferenciados, sendo que machos e fêmeas possuem a mesma composição cariotípica de 32m + 18sm.

Para a espécie *C. schubarti* (Figuras 11, 12 e 13), da qual foram coletadas três populações distintas, as análises citogenéticas mostraram a ocorrência de poucas diferenças entre elas, estando essas diferenças relacionadas apenas à posição do cromossomo sexual e à presença de cromossomos supranumerários.

Em algumas espécies foi possível visualizar a presença de cromossomos supranumerários, todos acrocêntricos e de tamanho reduzido, variando de 0 a 2 cromossomos em *C. lauroi* (Figura 8) e *C. japuhybense* (Figura 10), e de 0 a 1 cromossomo em *C. schubarti* (sma) (Figura 13) e *Characidium* sp.1 (Figura 14).

A visualização das RONs por coloração pelo nitrato de prata identificou o par portador dessas regiões como o par de cromossomos sexuais, estando as RONs em posição terminal dos braços longos, tanto nos cromossomos Z, quanto nos cromossomos W em todas as espécies analisadas que apresentaram esse sistema (Figuras de 8 a 13 – caixas). Nas espécies *Characidium* sp.1 e *Characidium* cf. *zebra*, as RONs foram evidenciadas no primeiro par 16 de cromossomos submetacêntricos e no par 23 também de cromossomos submetacêntricos, respectivamente (Figuras 14 e 15 – caixas). Essas

marcações foram confirmadas pelas técnicas de CMA_3 (Figuras 8 a 15, letras **d** e **h**) e de FISH com sonda de DNAr 18S (Figuras 8 a 15, letras **e** e **i**). Além das RONs, a técnica de CMA_3 evidenciou regiões CG-ricas em mais dois pares de cromossomos submetacêntricos em todas as espécies. Nenhuma outra marcação de FISH com sonda de DNAr 18S foi encontrada nos cariótipos estudados.

Outra característica dos cromossomos sexuais está relacionada à heterocromatina constitutiva, sendo que o cromossomo W apresentou-se totalmente heterocromático, com o Z apresentando blocos heterocromáticos nas posições terminais e pericentroméricas, em todas as espécies analisadas (Figuras 8 a 13, letras **c** e **g**). Os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos em *C. japuhybense*, *C. lauroi* e *Characidium* sp.1; em *C. schubarti* (sma) o cromossomo supranumerário apresentou blocos heterocromáticos terminais contrastando com a eucromatina presente na sua região pericentromérica (Figuras 10, 13 e 14, letras **c** e **g**). Os demais cromossomos do complemento de todas as espécies apresentaram apenas blocos heterocromáticos pericentroméricos, sendo que algumas dessas marcações foram CG-ricas.

A marcação de FISH com sonda de DNAr 5S mostrou apenas um par portador dessas marcações em todas as espécies analisadas, par esse submetacêntrico pequeno marcado na região intersticial do braço longo (Figuras 8 a 14, letras **f** e **j**), com exceção de *Characidium* cf. *zebra*, na qual essa marcação foi localizada no maior par de submetacêntrico do complemento, porém intersticial no braço curto (Figura 15**f**).

O uso do marcador PCR-RFLP possibilitou a separação clara das espécies estudadas, uma vez que o padrão de digestão observado para as enzimas aplicadas (Anexo 1) permitiu identificar padrões haplotípicos de DNAmt espécie-específicos (Figura 16). Uma exceção a isso é a espécie *C. lauroi* e a espécie *Characidium* sp.

“piabanha”, que compartilharam o mesmo haplótipo conjugado, como exemplificado na Tabela 4.

Com base na análise de ausência/presença dos sítios de restrição, foi possível reconstruir uma árvore filogenética bastante resolutiva para o grupo *C. lauroi*, como mostrado na Figura 17. Essa árvore apresenta dois grandes clados, na qual o clado1 é formado por *Characidium* cf. *zebra* e *Characidium* sp.1. O clado 2 é formado pelas demais espécies analisadas e pode ser subdividido em dois outros clados, em que o clado 3 é composto pelas populações de *C. schubarti* e o clado 4 por *C. japuhybense*, *Characidium* sp.2 e *C. oiticicai*, além de *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha”, que apresentaram o mesmo haplótipo conjugado.

Discussão

Todas as espécies do gênero *Characidium* estudadas no presente trabalho apresentaram número diplóide constante e macroestrutura cariotípica estável, com a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos no seu complemento. No entanto, a presença de cromossomos supranumerários, cromossomos sexuais e de RONs associadas a cromossomos sexuais reforça o fato de que o gênero *Characidium* apresenta uma grande variabilidade citogenética entre seus representantes (Maistro *et al*., 1998, 2004; Centofante *et al*., 2001, 2003; Vicari *et al*., 2008; Noletto *et al*., 2009; Alves *et al*., 2010). Além disso, os resultados encontrados agora estão de acordo com os resultados previamente descritos para as espécies *C. lauroi* (Centofante *et al*., 2003; Alves *et al*., 2010) e *C. schubarti* (Alves *et al*., 2010).

A presença de cromossomos sexuais diferenciados em algumas espécies do gênero *Characidium* e a ausência de diferenciação sexual cromossômica em

Characidium cf. *zebra*, considerada a espécie morfologicamente basal para o gênero (Buckup, 1993) fizeram com que alguns autores considerassem que as espécies portadoras de sistema sexual representassem um subgrupo particular dentro da subfamília Characidiinae, subgrupo esse composto pelas espécies *Characidium* cf. *alipioi*, *C. pterostictum*, *C. lanei* e algumas populações de *C. gomesi* (Centofante *et al*., 2001, 2003; Vicari *et al*., 2008; Noleto *et al*., 2009; Alves *et al*., 2010). O sistema de cromossomos sexuais dessas espécies teria evoluído a partir de um par cromossômico promotor sexual, no qual ambos os cromossomos Z e W teriam sofrido modificações na sua forma e tamanho, provavelmente causadas por duplicações, deleções e/ou inversões, em relação à suposta condição ancestral, na qual o mecanismo de heterocromatinização parece ter sido um importante fator na diferenciação do cromossomo W entre populações/espécies, em um padrão independente entre elas (Vicari *et al.*, 2008).

Os resultados encontrados com relação a presença do sistema ZZ/ZW nas espécies do grupo *C. lauroi* estudadas no presente trabalho, em conjunto com os dados disponíveis para *C. oiticicai* (Alves *et al*., 2010), diponíveis na Tabela 1 (introdução), indicam que as espécies do grupo *C. lauroi* podem fazer parte do subgrupo de Characidiinae proposto (Vicari *et al*., 2008; Alves *et al*., 2010), sendo a presença de cromossomos sexuais diferenciados uma característica restrita a esse subgrupo de espécies, não somente ao grupo *C. lauroi*.

Segundo Oliveira *et al*. (1988), a fixação de rearranjos cromossômicos diferentes seria mais viável em populações isoladas e com baixa vagilidade. Como as espécies do grupo *C. lauroi* apresentam essa característica, a variação na posição dos cromossomos sexuais diferenciados nas espécies do grupo *C. lauroi* pode ser explicada com base nesse pressuposto.

A caracterização das RONs pode ser um marcador citogenético para estudos citotaxonômicos e pode ajudar na proposta de hipóteses filogenéticas para vários grupos de peixes (Amemyia e Gold, 1988; Galetti Jr., 1998; Almeida-Toledo, 2000). Alguns desses grupos apresentam sistemas de RONs simples com a presença de cístrons ribossomais em um par cromossômico, enquanto que outros grupos apresentam sistemas de RONs múltiplas com cístrons ribossomais dispersos por vários cromossomos no complemento (Galetti Jr., 1998).

Para algumas espécies do gênero *Characidium*, sistemas múltiplos de RONs já foram reportados (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Vicari *et al*., 2008), apesar de o mais comum ser a presença de RONs simples, como pode ser observado para as espécies do grupo *C. lauroi* estudadas no presente trabalho, confirmada pela FISH de DNAr 18S.

Nas espécies que pertencem ao grupo *C. lauroi*, foi possível observar que as RONs estão presentes nos cromossomos sexuais diferenciados. A ocorrência de RONs em cromossomos sexuais de peixes foi relatada para poucas espécies, como *Fundulus diaphanus* (Howell e Black, 1979), *Salvelinus alpinus* (Reed e Phillips, 1997), *Triportheus guentheri* (Artoni, 1999), *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000) e *Hisonotus* sp. A (Andreata *et al*., 2002). No gênero *Characidium*, esse relato foi feito nas espécies *C. pterostictum*, *C. lanei*, *C. lauroi*, *C. schubarti* e *C. oiticicai* (Noleto *et al*., 2009; Alves *et al*., 2010).

Alves *et al*. (2010), analisando as espécies que apresentam RONs associadas aos cromossomos sexuais no gênero *Characidium*, propuseram que a presença de cístrons ribossomais nesses cromossomos seria anterior aos processos de diferenciação sexual, sugerindo ainda que esses cromossomos sexuais teriam se originado uma única vez nesse no gênero *Characidium*. A origem única de um sistema de cromossomos sexuais para um grupo de peixes já foi descrita para o gênero *Triportheus* e *Leporinus*, no qual

todas as espécies analisadas citogeneticamente apresentaram cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW (Galetti Jr *et al*., 1995; Diniz *et al*., 2008).

Por ser uma região rica em CG do DNA, as RONs podem ser visualizadas por meio do tratamento com fluorocromos, como a Cromomicina A_3 (CMA_3), que permite a visualização dessas regiões independentemente da sua atividade na interfase anterior (Schmid, 1980; Schmid e Guttembach, 1988). No entanto, o uso de fluorocromos para estudos de RONs pode não ser conclusivo pelo fato de algumas regiões heterocromáticas também apresentarem conteúdos ricos em CG, não associados às RONs (Mandrioli *et al*., 2001; Souza *et al*., 2001).

No presente estudo, as RONs também puderam ser visualizadas pelo tratamento por CMA_3. No entanto, outras marcações mais fracas foram visualizadas, relacionadas às regiões de heterocromatina constitutiva, o que mostra a efetividade dessa técnica na visualização de regiões CG-ricas do DNA, tanto associadas às RONs, quanto associadas às regiões de heterocromatina constitutiva em peixes.

A heterocromatina constitutiva é usualmente associada a genes inativos ou ao DNA de replicação tardia, sendo comumente encontrada em centrômeros e telômeros, ou intercalada com as RONs (Sumner, 2003). Essa associação de RONs com heterocromatina constitutiva parece ser uma característica comum em peixes e tem sido descrita para várias espécies (Martins e Galetti Jr., 1997, entre outras), e pode ser visualizada para as espécies do gênero *Characidium* estudadas no presente trabalho.

A presença de marcações de CMA_3 relacionadas a regiões de heterocromatina constitutiva pode ser considerada, para as espécies do grupo *C. lauroi*, um marcador citogenético para essas espécies, uma vez que estão presentes em dois pares submetacêntricos em todas as espécies do grupo, característica essa não presente na espécie *Characidium* cf. *zebra* (Figura de 8 a 15, letras **d** e **h**).

A heterocromatina constitutiva pode ser um fator importante na evolução cariotípica em peixes, em níveis intra-populacionais, com ocorre em *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al*., 2000), ou inter-populacionais, como ocorre em *Hoplias malabaricus* (Molina *et al*., 2008). A visualização de heterocromatina constitutiva apenas nas regiões pericentroméricas nos cromossomos estudados já era esperada, pois, para o gênero *Characidium*, a heterocromatina constitutiva parece estar associada somente à diferenciação dos cromossomos sexuais, tendo grande importância na evolução desse sistema no gênero (Vicari *et al*., 2008).

Nos peixes Characiformes, o DNAr 5S é geralmente localizado em posição intersticial em dois pares de cromossomos autossômicos que são usualmente não sintênicos com os sítios de DNAr 18S, sugerindo que esta pode ser uma condição comum na organização do gene 5S no genoma desses peixes (Martins e Galetti Jr., 1999; 2000; 2001; Born e Bertollo, 2000). No entanto, variações no que diz respeito ao número e localização dos sítios de DNAr 5S têm sido descritas para muitas espécies de peixes. Marcações múltiplas têm sido descritas para algumas espécies de salmonídeos que mostram até oito marcações localizadas em cromossomos autossômicos distintos (Fujiwara *et al*., 1998), e para *Astyanax scabripinnis*, que apresenta oito sinais de 5S em quatro pares de cromossomos distintos (Ferro *et al*., 2001). Freqüentemente, diferenças no número e localização do DNAr 5S têm sido reportadas como um bom marcador cromossômico para discriminar espécies próximas de peixes, como em algumas famílias da Ordem Mugiliformes e Perciformes (Gornung *et al*., 2001; Molina e Galetti, 2002; Rossi *et al*., 2005).

Com isso, a presença de um par marcado com a sonda de DNAr 5S nas espécies do gênero *Characidium* estudadas até o momento (Vicari *et al*., 2008; Noleto *et al*., 2009), também visualizada nas espécies *C. lauroi*, *C. japuhybense*, *C. schubarti*,

Characidium sp. “piabanha” e *Characidium* cf. *zebra* do presente estudo, pode ser considerada um marcador citogenético para o gênero *Characidium*. Todas as espécies do gênero apresentaram essa marcação em par de cromossomos submetacêntrico pequeno não identificado, com exceção de *Characidium* cf. *zebra*, a qual apresentou essa marcação no maior par de cromossomos submetacêntricos. Essa diferença encontrada na espécie considerada basal morfologicamente indica que a presença de DNAr 5S em um par cromossômico pequeno do tipo submetacêntrico é restrita a um grupo de espécies dentro do gênero *Characidium*. Coincidentemente, as espécies estudadas por meio de FISH com sonda de DNAr 5S também apresentaram cromossomos sexuais diferenciados, reforçando a existência do subgrupo de espécies proposto anteriormente (Centofante *et al*., 2001, 2003; Vicari *et al*., 2008; Noleto *et al*., 2009; Alves *et al*., 2010), no qual se encaixa o grupo *C. lauroi*.

Com relação aos cromossomos supranumerários, essa classe de cromossomos já foi descrita para algumas espécies do gênero *Characidium*, como em *Characidium* cf. *zebra*, *C. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* (Miyazawa e Galetti Jr.,1994; Maistro *et al.*, 1998; Maistro *et al*., 2004; Centofante *et al*., 2003, Alves *et al*., 2010). A presença desses cromossomos em *C. japuhybense*, *C. lauroi* e *C. schubarti* (sma) estudadas aqui, indicam que os cromossomos supranumerários no gênero *Characidium* originaram-se independentemente em cada espécie, uma vez que esses cromossomos apresentaram forma, tamanho e estágio de heterocromatinização diferenciado nas espécies nas quais ocorrem.

A ocorrência de simpatria nas espécies do gênero *Characidium* já foi relatada em três trabalhos, sendo dois desses relacionados às espécies *Characidium* cf. *zebra* e *C. gomesi* (Centofante *et al*., 2001; Silva e Maistro, 2006). O terceiro caso de simpatria no gênero envolve uma espécie do grupo *C. lauroi*, sendo relatado para *C. lauroi* e

Characidium cf. *alipioi* (Centofante *et al*., 2003). No presente trabalho, a espécie *C. lauroi* também foi encontrada em simpatria com outra espécie, *Characidium* sp.1, cujo cariótipo assemelha-se aquele descrito para *C.* cf. *alipioi*, com a ressalva de que nesse, cromossomos sexuais foram descritos, o que não pode ser visualizado no presente trabalho pela captura exclusiva de fêmeas. Portanto, como *Characidium* sp.1 é morfologicamente bastante semelhante a *C. lauroi*, estudos envolvendo outras metodologias deverão ser utilizadas para a correta identificação dessa possível espécie nova para o gênero *Characidium*.

A espécie *Characidium zebra*, como já citada anteriormente, é considerada morfologicamente a mais basal na filogenia do gênero, apresentando várias características plesiomórficas (Buckup, 1993b). Nesse sentido, o cariótipo dessa espécie pode ser caracterizado como basal para o gênero e variações cromossômicas apresentadas pelas demais espécies podem ser explicadas pela ocorrência de vários rearranjos cromossômicos (Alves *et al*., 2010).

A partir disso, pode-se verificar que os cariótipos de *C. lauroi*, *C. japuhybense*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. “piabanha”, apresentaram certa similaridade, com todas essas apresentando fórmula cariotípica, localização das RONs em cromossomos sexuais, marcações de FISH e de CMA_3 similares, além de marcações heterocromáticas apenas pericentroméricas. Somando isso às características encontradas em *C. oiticicai* (Alves *et al*., 2010), podemos dizer que as espécies que fazem parte do grupo C. *lauroi* apresentam as mesmas características citogenéticas em relação à fórmula cariotípica (32m + 18sm em machos, e 31m + 19sm em fêmeas) e localização das RONs (no par de cromossomos sexual), reforçando desse modo, a existência do grupo *C. lauroi* dentro do gênero *Characidium* e do subgrupo de espécies proposto anteriormente na qual o grupo *C. lauroi* se encaixa.

Em relação à topologia encontrada na análise de PCR-RFLP para as espécies do grupo *C. lauroi* (Figura 17), podemos dizer que *Characidium* cf. *zebra* mostrou-se externa ao grupo. No entanto, quando comparada com a topologia baseada em caracteres morfológicos (Figura 3 - introdução), a topologia encontrada no presente trabalho apresenta alguns pontos divergentes.

A espécie *C. schubarti* apresentou-se como basal para o grupo, ao invés de *C. japuhybense*. Essa última espécie apresentou-se como espécie irmã de *Characidium* sp.2, constituindo, dessa forma, um clado irmão das espécies *C. lauroi*, *Characidium* sp. "piabanha" e *C. oiticicai*. A relação íntima entre *C. lauroi* e *Characidium* sp. "piabanha" foi recuperada na topologia molecular, porém como uma única espécie. *Characidium* sp.1 agrupou com *Characidium* cf. *zebra*, confirmando que essa espécie não se relaciona às espécies do grupo *C. lauroi*. Esses resultados indicam que a técnica de PCR-RFLP pode auxiliar na resolução das relações evolutivas entre as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi* (Figura 17).

A evolução das espécies do grupo *C. lauroi* encaixa-se no modelo de especiação alopátrica, na qual barreiras vicariantes são responsáveis pela segregação das populações ancestrais em áreas diferentes, tais como os eventos de separação das bacias durante o Pleistoceno (Melo, 2001). No entanto, as relações entre as posições das espécies na topologia baseada em dados morfológicos com os eventos de separação das bacias onde elas ocorrem, não foram recuperadas na topologia baseada em dados moleculares, principalmente quando se observa a relação encontrada entre *C. japuhybense* e *Characidium* sp.2, de ocorrência em bacias hidrográficas distintas. Com isso, é necessária a utilização de mais ferramentas moleculares para os estudos das relações entre as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi*.

Somando os resultados citogenéticos e moleculares encontrados, podemos inferir que as populações formadas pelas espécies *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha” podem compor uma única espécie, no caso *C. lauroi*, por apresentam poucas diferenças citogenéticas entre si e nenhum diferença haplotípica. Os resultados também podem indicar que as diferentes populações de *C. schubarti* compõem uma única espécie e que suas diferenças citogenéticas podem estar associadas à presença de citótipos, confirmada pela baixa divergência encontrada em dados moleculares. Por último, podemos inferir a existência do grupo *C. lauroi*, principalmente no que diz respeito aos resultados encontrados com o uso de PCR-RFLP, uma vez que as características citogenéticas não foram visualizadas em todas as espécies do grupo e que, as que foram estudadas, apresentaram características próximas a outras espécies do gênero *Characidium*.

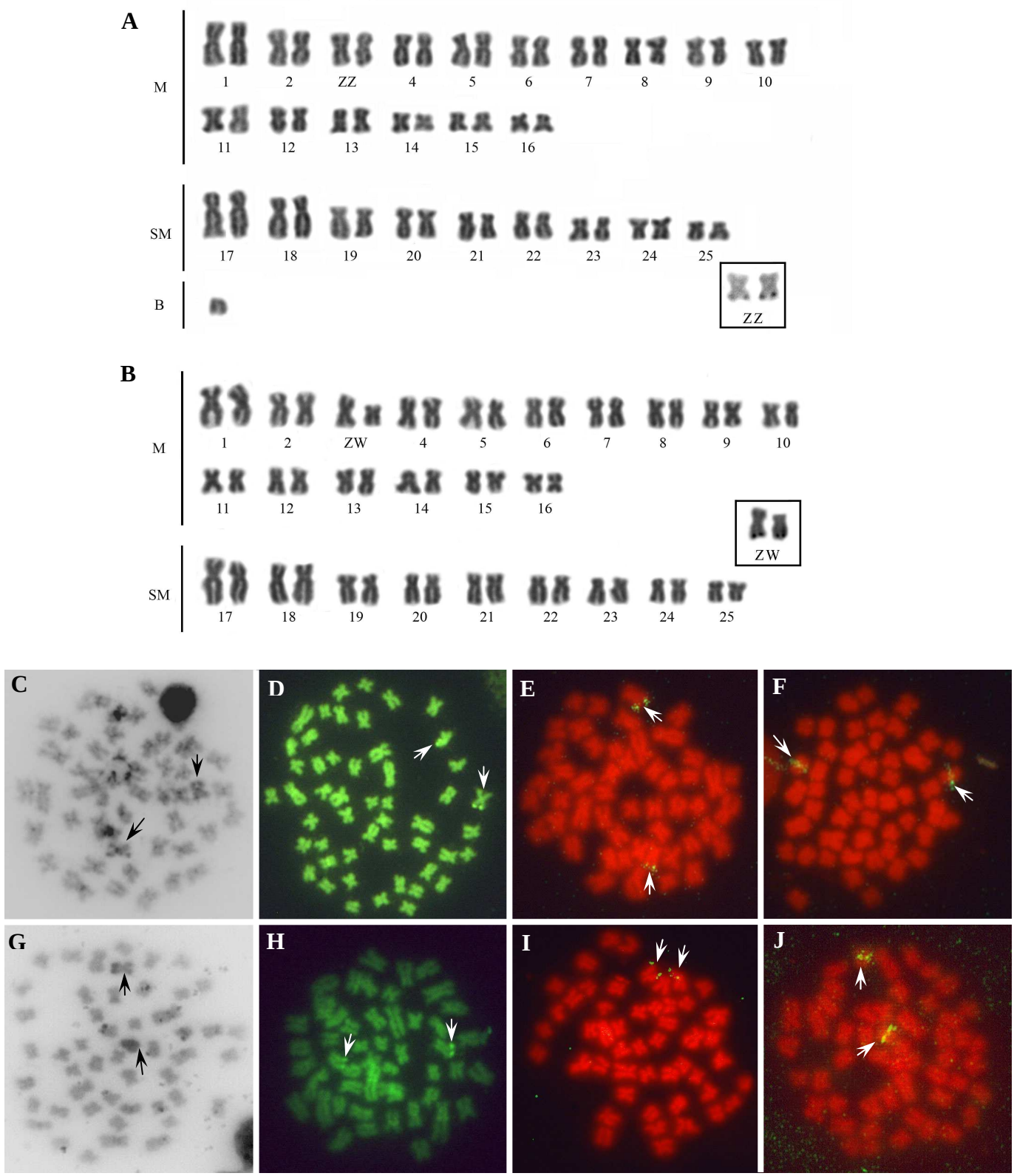


Figura 8: Cariótipos de *Characidium lauroi*. A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

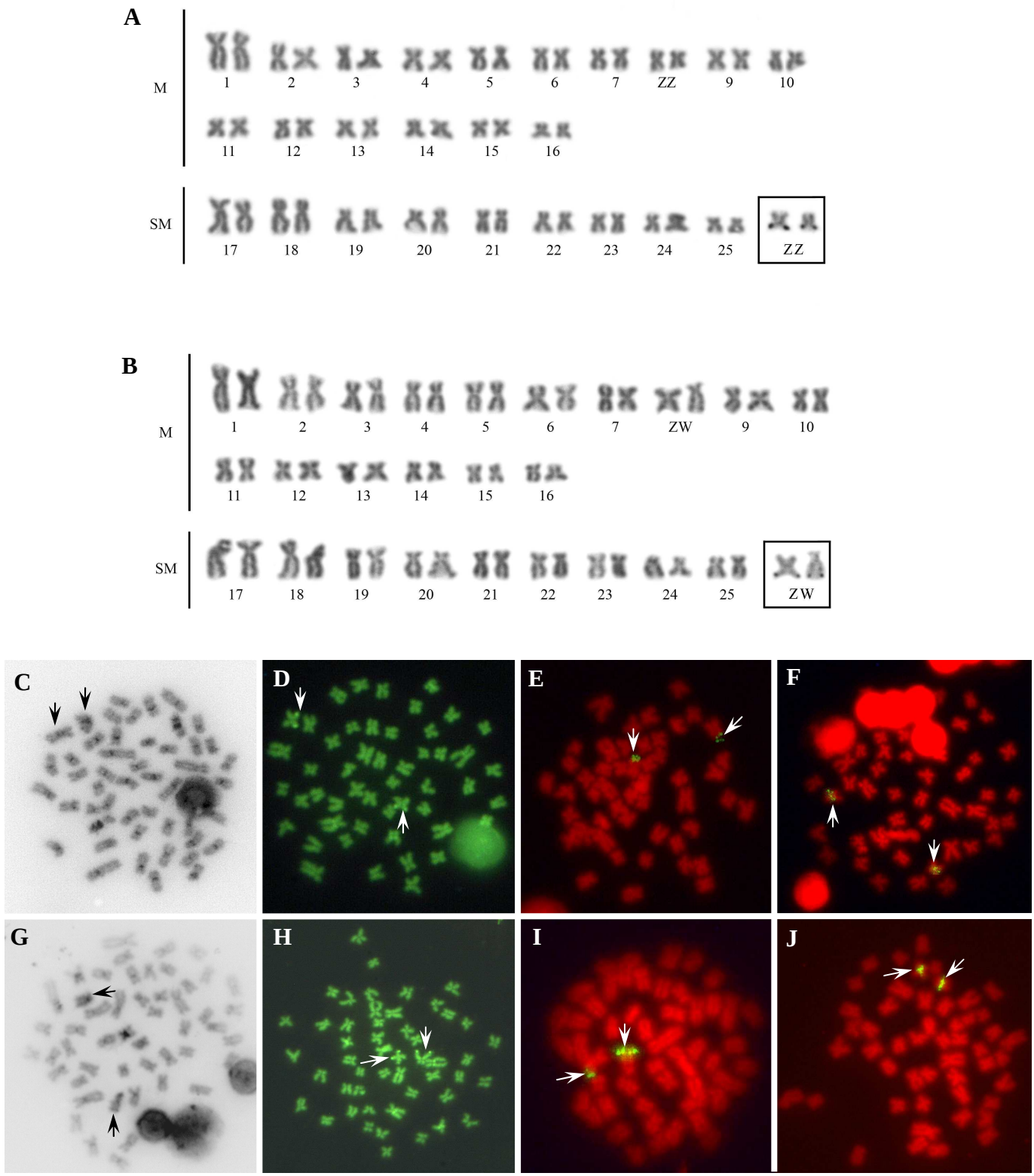


Figura 9: Cariótipos de *Characidium* sp. "piabanha". A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

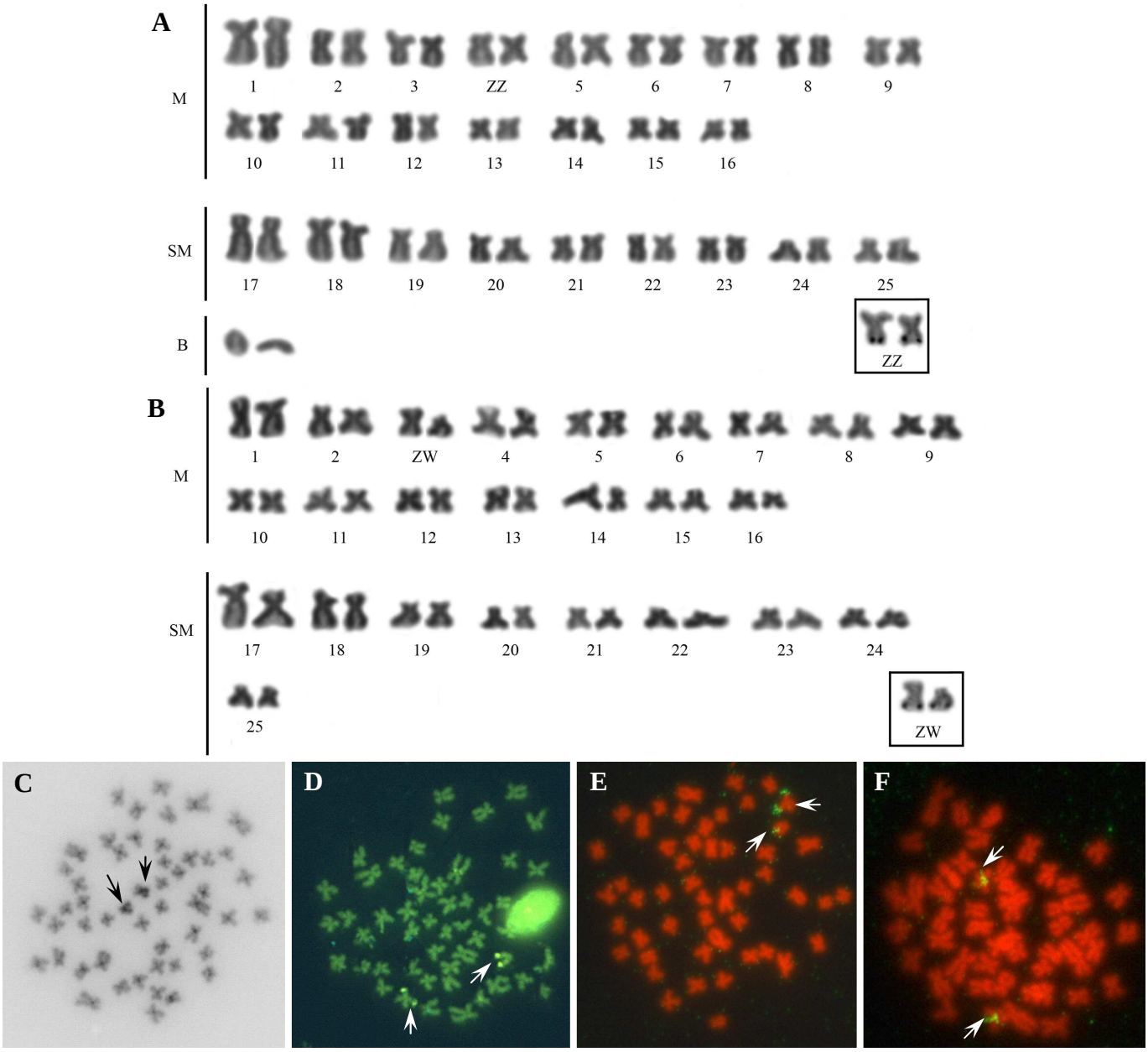


Figura 10: Cariótipos de *Characidium japuhybense*. A– cariótipo de macho. B, C, D, E e F - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

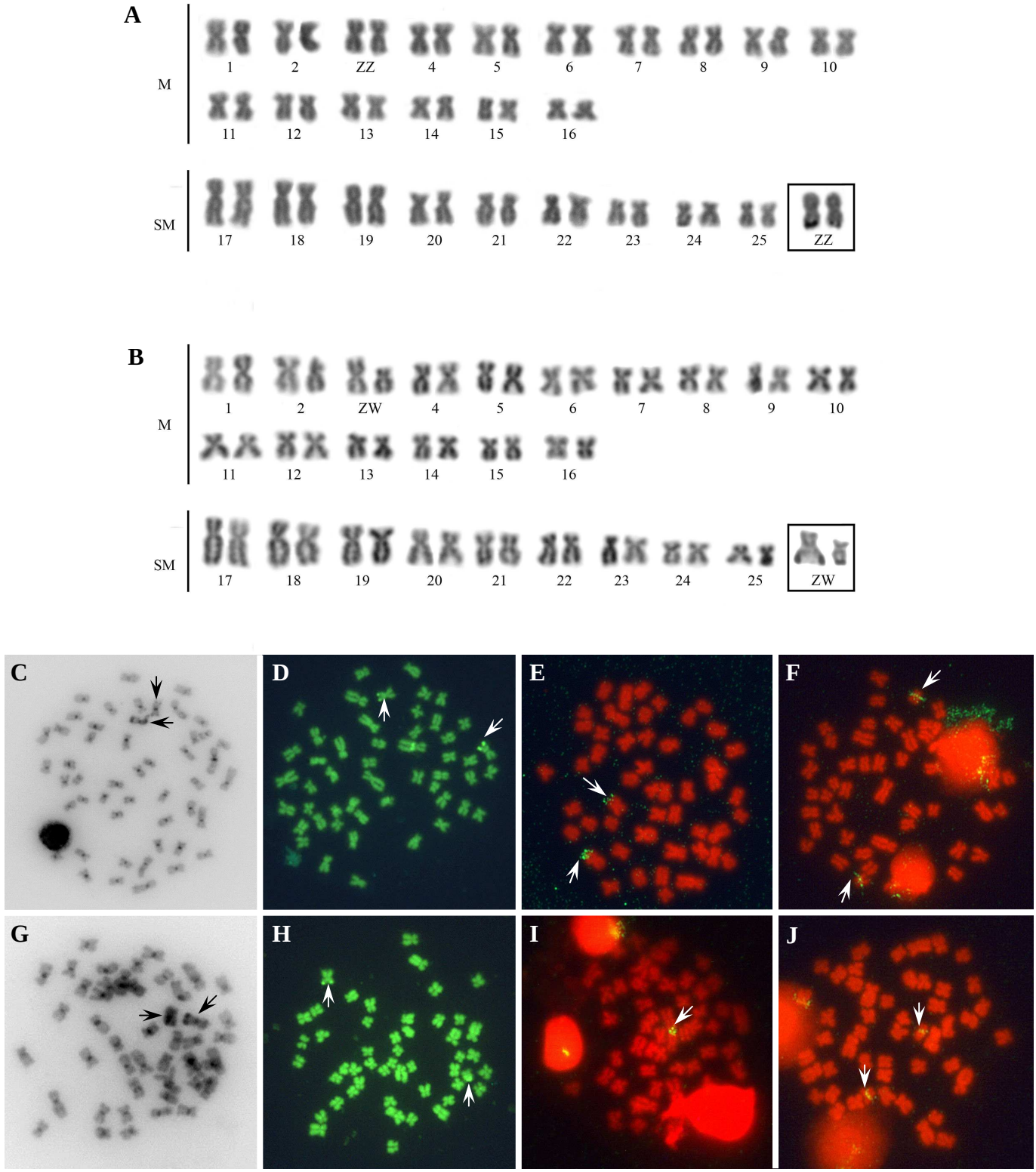


Figura 11: Cariótipos de *Characidium schubarti*. A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

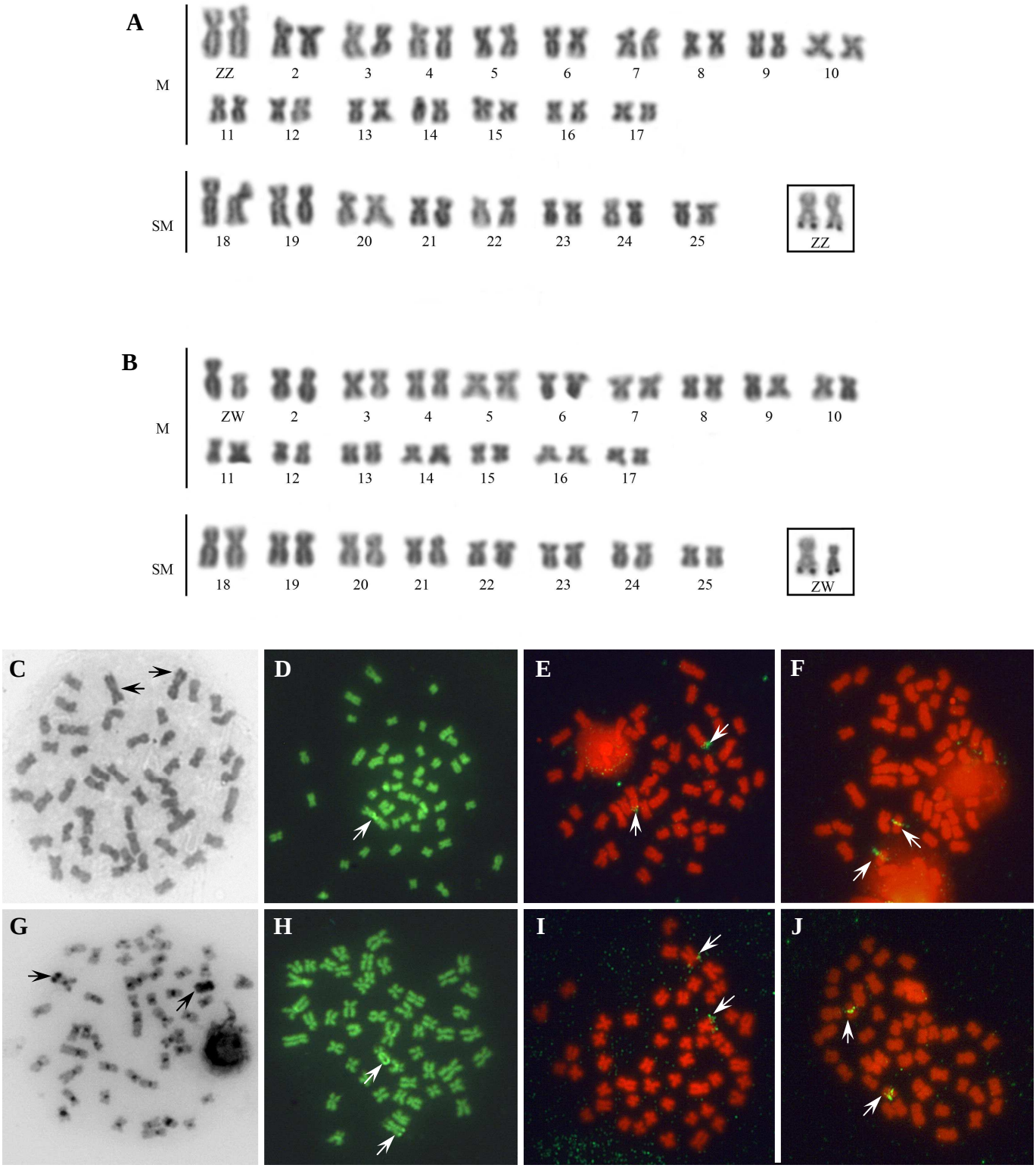


Figura 12: Cariótipos de *Characidium schubarti* (p2). A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

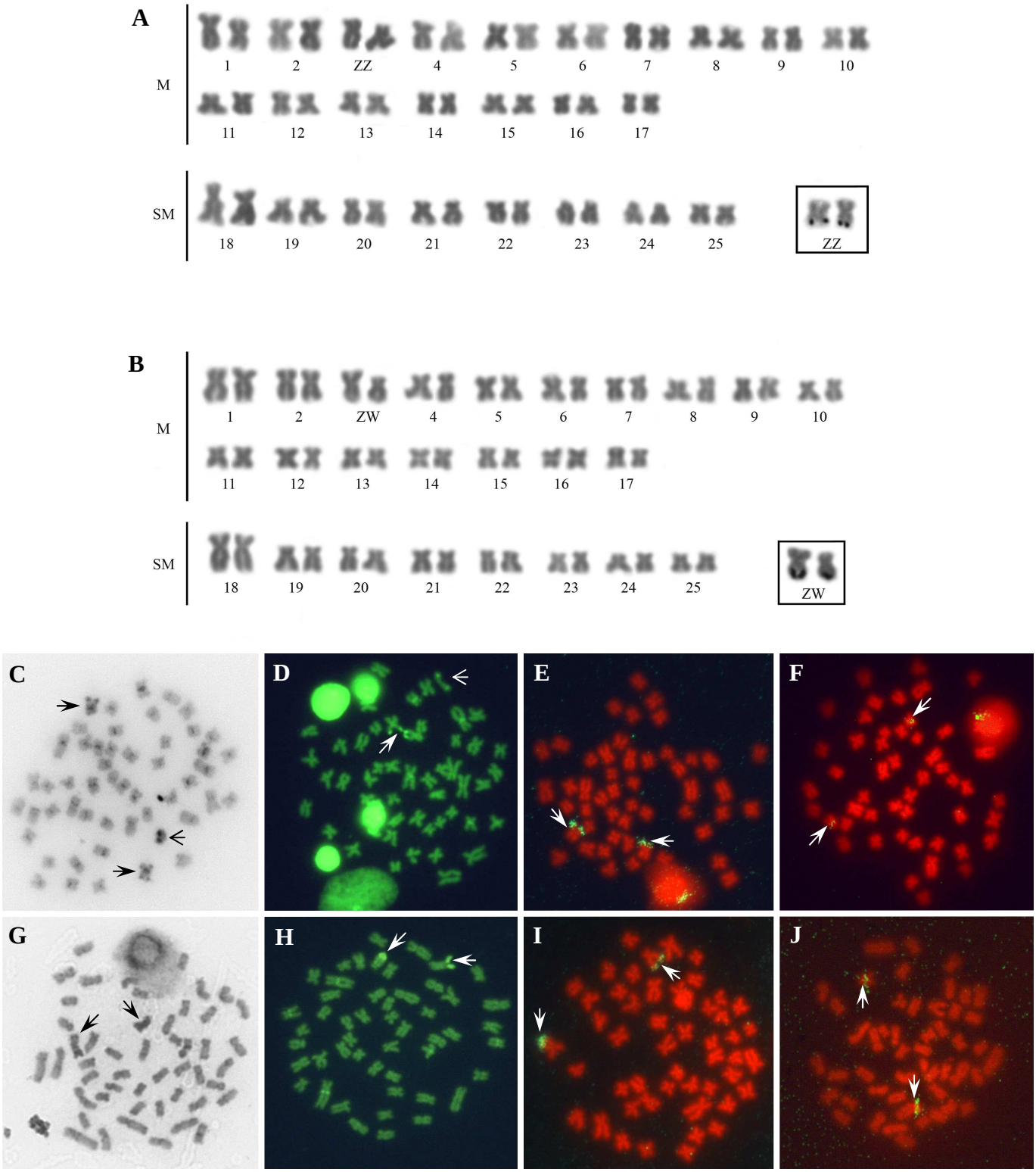


Figura 13: Cariótipos de *Characidium schubarti* (sma). A, C, D, E e F – cariótipo de macho; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente. B, G, H, I e J - cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

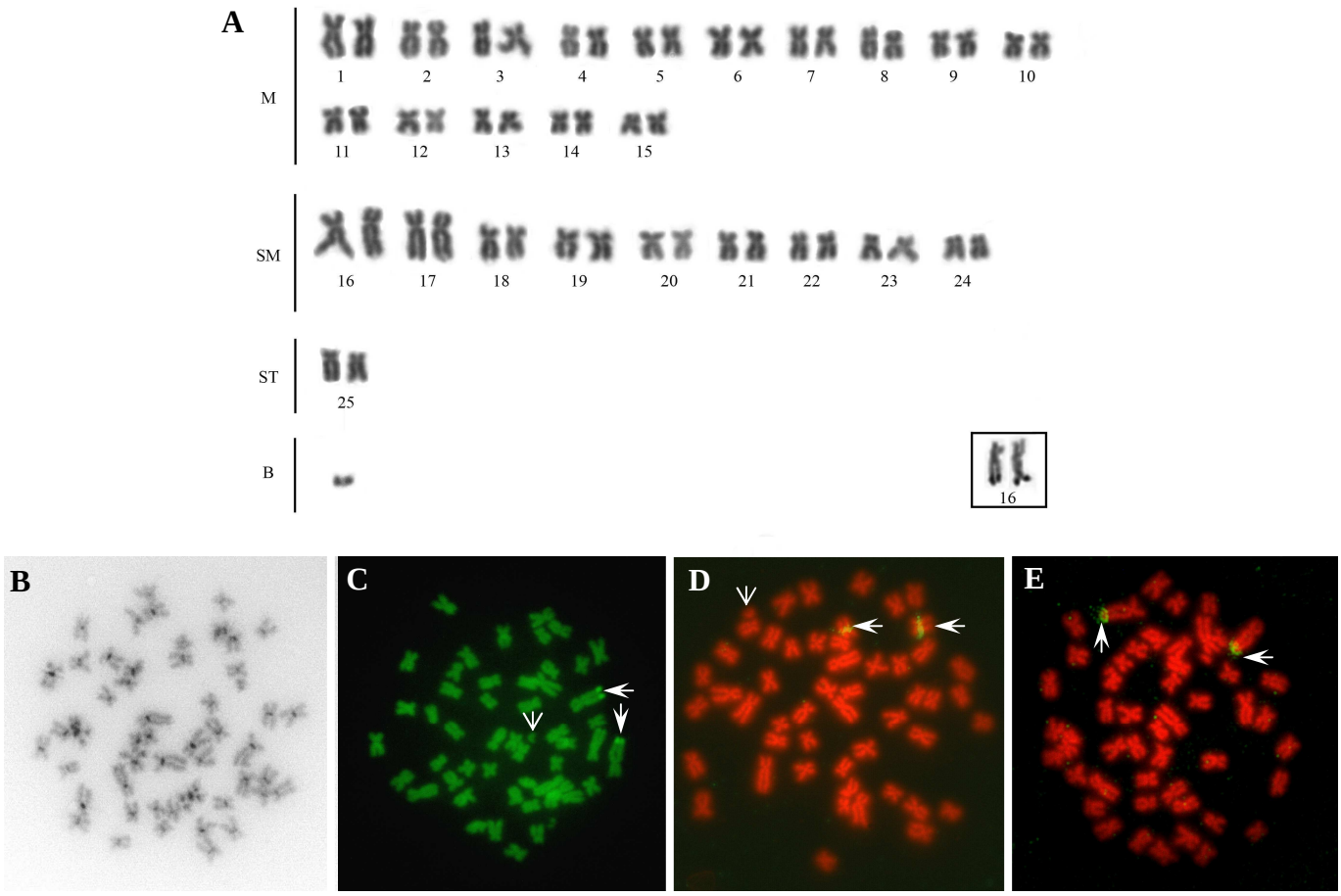


Figura 14: Cariótipos de *Characidium* sp.1. A, B, C, D, e E – cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

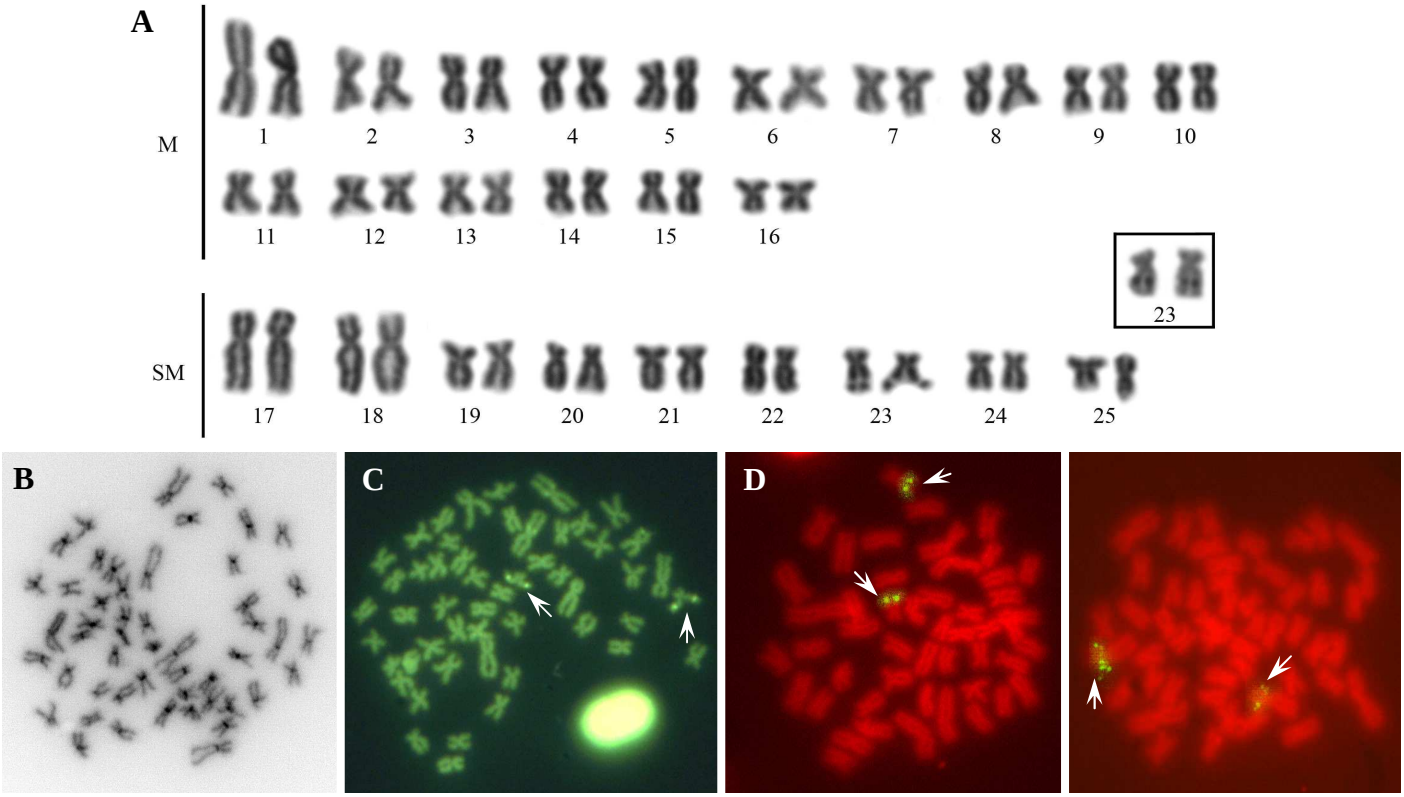


Figura 15: Cariótipos de *Characidium* cf. *zebra*. A, B, C, D e E – cariótipo de fêmea; metáfase com bandamento C, metáfase corada com CMA3, FISH com sonda de DNAr 18S e FISH com sonda de DNAr 5S, respectivamente.

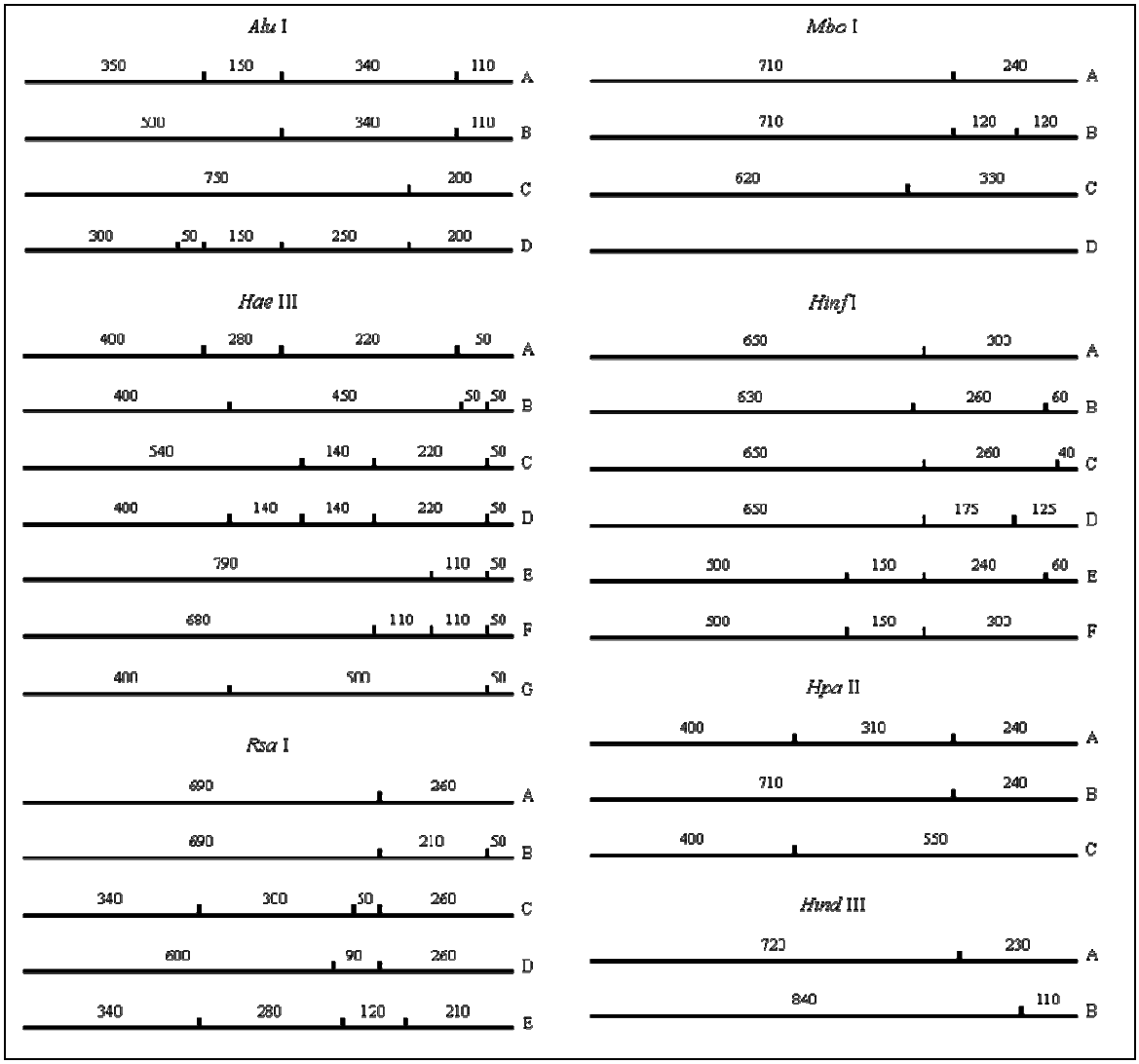


Figura 16: Mapas de restrição construídos com base nos cortes apresentados por cada enzima. As letras significam os haplótipos atribuídos para cada corte encontrado.

Tabela 5: Haplótipos conjugados e a quantidade de indivíduos utilizados para cada população.

	Alu I	*Hae* III	*Hind* III	*Hinf* I	*Hpa* II	*Mbo* I	*Rsa* II
Characidium sp.1 (5 indivíduos)	C	B	B	B	B	C	C
C. lauroi (11 indivíduos)	B	A	A	A	A	A	A
C. sp. “piabanha” (30 indivíduos)	B	A	A	A	A	A	A
C. japuhybense (15 indivíduos)	A	C	A	A	A	B	B
C. oiticicai (12 indivíduos)	A	D	A	A	B	A	A
C. schubarti (sma – 22 indivíduos)	B	E	A	D	A	D	A
C. schubarti (30 indivíduos)	B	E	A	C	A	D	A
C. schubarti (p2 – 10 indivíduos)	B	E	A	C	A	D	A
Characidium sp.2 (30 indivíduos)	B	F	A	A	A	B	A
Characidium cf.. *zebra* (30 indivíduos)	D	G	B	E	C	D	F

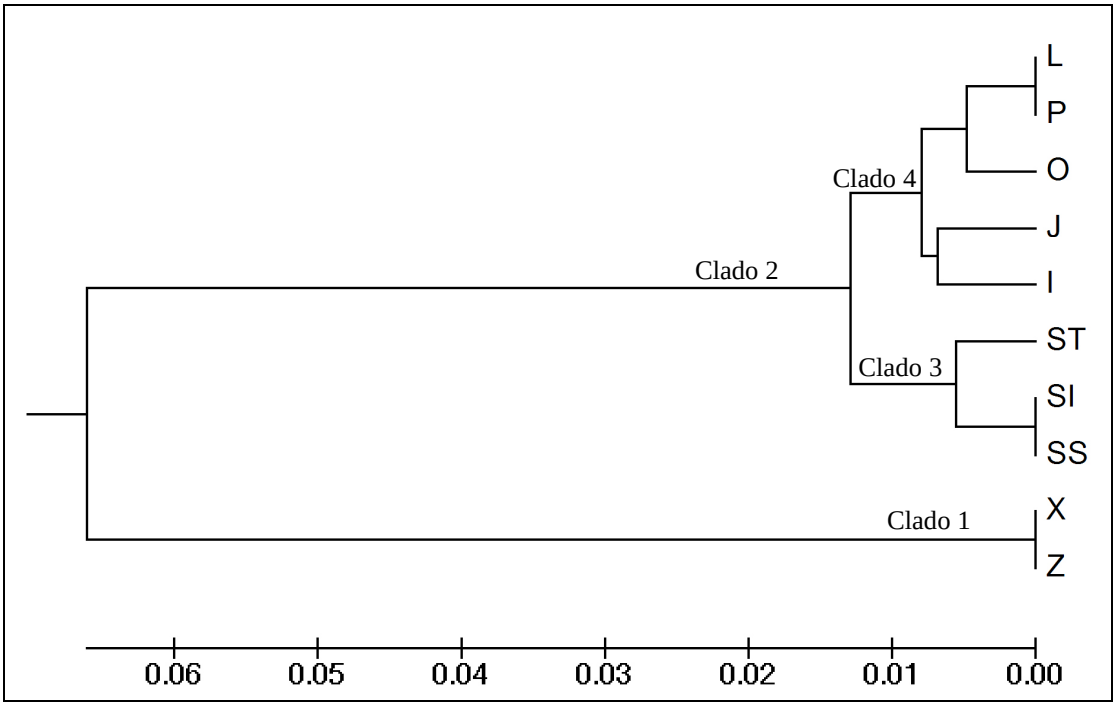


Figura 17: Árvore UPGMA construída com base nos haplótipos conjugados obtidos pela técnica de PCR-RFLP. Legenda: **L** – *C. lauroi*; **P** – *Characidium* sp. “piabanha”; **O** – *C. oiticicai*; **J** – *C. japuhybense*; **I** – *Characidium* sp.2; **ST** – *C. schubarti* (sma); **SI** – *C. schubarti*; **SS** – *C. schubarti* (p2); **X** – *Characidium* sp.1; **Z** – *C.* cf. *zebra*.

Capítulo 2

Capítulo 2

O uso do DNA *barcoding* na identificação de espécies do gênero *Characidium*, com enfoque no grupo *C. lauroi.*

Palavras-chave: grupo *Characidium lauroi*, COI, identificação de espécies, sequenciamento.

Resumo

O DNA *barcoding* tem se mostrado uma ferramenta muito importante na identificação de espécies de peixes, além de, em alguns casos, auxiliar na recuperação da história evolutiva de grupos de espécies próximas. As espécies do gênero *Characidium* podem tornar-se um grupo interessante para a aplicação dessa técnica, uma vez que algumas espécies desse gênero apresentam limites taxonômicos muito próximos, tais como as espécies que compõem o grupo *C. lauroi*. Nesse grupo, as relações entre espécies não foram ainda elucidadas de forma definitiva. Os resultados obtidos por meio do sequenciamento do gene da Citocromo c Oxidase 1 (COI) e análise filogenética indicam que as espécies *C. lauroi* e *Characidium* sp. "piabanha" são uma única espécie, da mesma forma que as populações de *C. schubarti*. No entanto, as espécies do grupo *C. lauroi* formam uma politomia com *C. pterostictum* e *C. lanei*. A situação em que se encontram as populações de *C. pterostictum* é discutida no presente capítulo, assim como as relações encontradas entre as espécies do grupo *C. lauroi*.

Abstract

DNA *barcoding* has become an important tool in the identification of fish species, and in some cases, assist in recovering the evolutionary history of groups of closely related species. The species of *Characidium* may become an interesting model for the application of this technique, since some species of this genus have very close taxonomic boundaries, such as the species that make up group *C. lauroi*. In this group, the relationships between species have not yet been elucidated definitively. The results obtained by the sequencing of the gene for Cytochrome c Oxidase 1 (COI) and phylogenetic analysis indicate that *C. lauroi* and *Characidium* sp. "piabanha" are a single species, in the same way that populations of *C. schubarti*. However, the species of group *C. lauroi* form a polytomy with *C. pterostictum* and *C. lanei*. The situation in which they are the populations of *C. pterostictum* is discussed in this chapter, as well as the relationships found between species of group *C. lauroi*.

Introdução

A técnica do DNA *barcoding* apresenta a proposta de utilizar uma única região gênica como base de um sistema global de bioidentificação para os animais (Hebert *et al*., 2003). Essa região gênica inclui os fragmentos do Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), para cuja sequência há, atualmente, uma ampla variedade de *primers* visando à amplificação de aproximadamente 655 pares de base (Folmer *et al*., 1994). O final 5' deste gene mitocondrial foi estabelecido como um alvo particularmente promissor para a identificação das espécies e seu poder de discriminar espécies estreitamente relacionadas é largamente atribuível à abundância de mudanças sinônimas que ocorrem em seus nucleotídeos (Ward e Holmes, 2007).

O princípio básico que sustenta a metodologia do DNA *barcoding* está associado à presença de divergência genética intraespecífica muito menor do que as diferenças genéticas entre as espécies, o que justifica o uso de valores de divergência genética para separar e identificar espécies (Toffoli *et al*., 2008).

A amplificação do COI mostrou-se eficaz para a identificação de espécies de muitos grupos animais (Waugh, 2007), para a validação da identidade de linhagens celulares (Lorenz *et al*., 2005; Cooper *et al*. 2007) e é um passo recomendado para a caracterização de materiais provenientes de repositórios de biodiversidade (Hanner e Gregory, 2007).

Há no entanto, em relação ao uso do DNA *barcoding*, muita controvérsia sobre a utilização de um único gene mitocondrial para identificação de espécies, sobre a capacidade de essa sequência discriminar espécies recentemente irradiadas e/ou espécies com extensa distribuição geográfica, assim como à sua capacidade de descobrir novas espécies (Moritz e Cícero, 2004; Hickerson *et al*., 2006; Rubinoff *et al*., 2006).

No entanto, o DNA *barcoding* promete ser uma ferramenta poderosa na identificação de espécies de peixes, acreditando-se que seu uso possa ampliar a compreensão da história natural e as interações ecológicas das espécies desse grupo (Ward *et al*., 2009).

Embora a saturação mutacional limite o valor das sequências do DNA *barcoding* para a resolução das relações ao nível filogenético, os dados obtidos por meio do uso do DNA *barcoding* estão atualmente sendo incorporados em diversos estudos de filogenia. Desse modo, o uso do DNA *barcoding* é complementar aos estudos filogenéticos, pois lança luz sobre linhagens divergentes para posterior inclusão dessas linhagens em análises filogenéticas (Hajibabaei *et al*., 2007).

Dada a dificuldade na identificação das espécies e a ausência de dados moleculares para as espécies do gênero *Characidium*, o DNA *barcoding* foi aplicado no presente estudo visando auxiliar a identificação das espécies, com ênfase no grupo de espécies relacionadas à *Characidium lauroi*, assim como para visualizar suas relações evolutivas.

Materiais e Métodos

Foram utilizados no presente trabalho cinco indivíduos de cada população, incluindo as espécies *C. lauroi, C. japuhybense, C. oiticicai, C. schubarti, Characidium* sp. "piabanha", *Characidium* sp.1, *Characidium* sp.2, *Characidium* cf. *zebra, C. pterostictum* e *C. lanei*; a localidade das populações estudadas está listada na Tabela 2 (materiais e métodos). A espécie *Astyanax mexicanus* foi utilizada como grupo externo para polarizar a árvore gerada na presente análise e sua sequencia foi retirada do GenBank. Para a obtenção da sequência do Citocromo oxidase subunidade 1 (COI) das

diferentes espécies, amostras de tecido (fígado, músculo ou nadadeira), preservadas em etanol absoluto foram utilizadas para a extração de DNA genômico total seguindo o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez, 1997). Para a amplificação da região mitocondrial de interesse, foram realizadas reações de PCR utilizando o par de primers VF1_t1 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G) + VR1_t1 (CAG GAA ACA GCT ATG ACT AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA ATC A) (Ivanova et al., 2006). As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research e as condições da PCR foram as seguintes: 94ºC (4 min), 10 ciclos de 92°C (0,5 min), 48°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), 40 ciclos de 92°C (0,5 min), 51°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), seguidos de um período de extensão final de 10 min a 72°C e um período de resfriamento a 4°C. Para realização da reação de sequenciamento utilizou-se o kit "BigDye Sequence Terminator v.3.1" (Applied Biosystems), seguindo as orientações do fabricante. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos a 96ºC por 30 segundos; 15 segundos a 50ºC; 4 minutos a 60ºC. Após término do ciclo de Big Dye, os produtos foram precipitados e seqüenciados (seqüenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI). Todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al*., 1994) pelo programa BioEdit (Hall, 1999) aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos, para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2), com edição manual onde fosse necessário. O programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007) foi utilizado para construir uma árvore de Neighbor-Joining (NJ), com base no modelo de distância de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980), com o teste de bootstrap (Felsenstein, 1985) utilizando 10.000 réplicas.

Resultados

Para todos os indivíduos utilizados no presente estudo, a amplificação da região gênica COI foi bem sucedida, tendo sido seqüenciados 575 pares de bases. Inserções, deleções ou códons de parada não foram encontrados nas sequências amplificadas, caracterizando-se assim uma sequência de DNA mitocondrial funcional.

Uma topologia de árvore foi obtida por meio do sequenciamento do COI, contendo todas as espécies do gênero aqui estudadas, incluindo as espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi* (Figura 18). As distâncias genéticas estão listadas na Tabela 6.

Com essa topologia, foi possível verificar que todos os indivíduos de uma mesma localidade apresentam um único haplótipo, compondo uma mesma espécie, isto é, cada população compreende representantes de uma única espécie. Isso, no entanto, não ocorreu no Rio dos Marins, onde duas coletas foram realizadas, possibilitando a coleta de duas espécies simpátricas, *Characidium* sp.1 e *C. lauroi*, muito divergentes entre si (0.1025), com *Characidium* sp.1 agrupando nas filogenias como grupo externo ao grupo *C. lauroi*, junto com *Characidium* cf. *zebra*.

Ao contrário disso, as espécies *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha” (espécies teoricamente distintas), compartilharam o mesmo haplótipo para as sequências do COI (Figura 18 e Tabela 6). Essa mesma relação foi encontrada entre as populações *C. schubarti* e *C. schubarti* (p2), que também compartilham o mesmo haplótipo. No entanto, a terceira população *C. schubarti* (sma) apresentou um haplótipo distinto das outras duas populações dessa espécie, porém com divergência baixa (0.0155), de forma que essas três populações devam compor um único clado (Figura 18).

Na árvore obtida no presente trabalho (Figura 18), foi possível recuperar as relações entre algumas das espécies do grupo *C. lauroi*, na qual as espécies *C. lauroi*, *C.*

japuhybense e *C. oiticicai* formam um clado único, porém com baixos níveis de divergência (de 0.0135 a 0.0175).

No entanto, a árvore encontrada apresentou uma politomia, com as espécies *C. pterostictum* e *C. lanei* posicionadas entre as espécies tidas como pertencentes ao grupo *C. lauroi*. A espécie *C. pterostictum* também não se mostrou monofilética, sendo que a população de Cajati mostrou-se mais relacionada com *C. lanei* do que com as demais populações de *C. pterostictum* (ver valores de divergência Tabela 6).

Discussão

A utilidade do sistema de DNA *barcoding* baseado na região mitocondrial COI para a identificação e descoberta de espécies tem mostrado resultados promissores em alguns casos (Burns *et al*., 2008; Foottit *et al*., 2009), mas limitações em outros (Elias *et al*., 2007).

Ward *et al*. (2005) propuseram que, além de identificar espécies, as análises das sequências do COI poderiam também agrupar espécies supostamente distintas, desde que elas tivessem sequências idênticas de COI e que fossem feitas análises morfológicas em paralelo. Para o grupo *Characidium lauroi*, foi possível recuperar uma mesma identidade genética para as diferentes populações de *C. lauroi* com *Characidium* sp. “piabanha”, com valores de divergência iguais a 0, mesmo quando essas duas entidades mostraram cariótipos divergentes (mostrado no capítulo 1 para *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha”), da mesma forma que acontece para *C. schubarti* e *C. schubarti* (p2).

A ausência de divergência entre as populações de *C. lauroi*, incluindo *Characidium* sp. “piabanha” citadas acima, indica que essas populações foram separadas recentemente, o que também pode ser visto pelos resultados apresentados pela

técnica de PCR-RFLP, segundo os quais essas populações apresentaram haplótipos conjugados idênticos (capítulo 1). Com isso, podemos dizer que as diferenças cariotípicas encontradas em *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha” não são acompanhadas por grandes mudanças nas sequências do DNA mitocondrial, o que corrobora a presença de citótipos diferentes dentro dessa espécie.

A diferenciação das três populações de *C. schubarti* em duas linhagens, com valores baixos de divergência (0.0155), separação essa também observada pela técnica de PCR-RFLP, pode estar associada a um possível processo inicial de especiação, uma vez que os dois clados formados (Figura 18) são geograficamente separados pela calha principal da Bacia do Rio Paranapanema, que nesse caso pode ser considerada uma barreira geográfica, uma vez que as espécies do gênero *Characidium* formam populações pequenas e isoladas em cabeceiras de riachos (Buckup, 1993b). No entanto, pelo pressuposto do DNA *barcoding*, esses valores baixos de divergência apontam para a existência de uma única espécie para essas populações de *C. schubarti*.

Por sua vez, a separação de *C. pterostictum* em duas linhagens com divergência nucleotídica de 0.0673, pode estar relacionada à identificação de duas espécies com base nos pressupostos do *barcoding*, uma *C. pterostictum* (com as populações *C. pterostictum* e *C. pterostictum* pr) e outra linhagem muito semelhante morfologicamente a *C. pterostictum*, porém mais relacionada com *C. lanei*.

Grande parte das críticas relacionadas à utilização do DNA *barcoding* concentra-se no fato de que os estudos utilizando essa metodologia não comparam espécies irmãs, as candidatas primárias a compartilhar haplótipos e a mostrar baixas divergências interespecíficas (Moritz e Cícero, 2004).

Essa comparação foi feita no presente trabalho, nos quais os baixos valores de divergência nucleotídica apresentadas entre as espécies *C. lauroi*, *C. japuhybense* e *C.*

oiticicai (de 0.0135 a 0.0175) apontam, pelos pressupostos do *barcoding*, que essas, na verdade, possam ser de uma única espécie. No entanto, essas espécies são distintas morfologicamente, com distribuição geográfica bem definida, mostrando que a aplicabilidade do DNA *barcoding* em separar espécies recentemente irradiadas é limitada, como proposto por Valdez-Moreno *et al*. (2009). Esse mesmo resultado já foi encontrado para arraias do gênero *Potamotrygon* da bacia Amazônica, na qual duas espécies bem definidas apresentaram baixos valores de divergência (Toffoli *et al*., 2008).

Outra crítica ao uso do DNA *barcoding* está relacionada à ausência de dados de diversidade na área de distribuição de uma mesma espécie (Moritz e Cícero, 2004), o que foi possível verificar no presente trabalho. A espécie *C. lauroi*, da qual quatro populações foram analisadas por meio dessa metodologia, apresentou valores de divergência nucleotídica iguais a 0.0 (Tabela 6), mostrando que essas diferentes populações compõem uma única espécie. No entanto, como as espécies do gênero *Characidium* formam populações isoladas em cabeceiras de riachos (Buckup, 1993b) era esperado que alguma divergência entre elas fosse encontrada, como ocorreu para as populações de *C. schubarti* citadas acima. Os resultados obtidos, para as populações de *C. lauroi*, podem indicar que a separação das populações estudadas no presente trabalho foi um processo recente, também verificado pela técnica de PCR-RFLP (capítulo 1), de modo que possíveis divergências no DNA mitocondrial ainda não foram fixadas, apresentando, porém, já alguma divergência cariotípica (capítulo 1).

Embora análises baseadas em sequências do COI não tenham a perspectiva de ser uma ferramenta filogenética, essas análises de fato fornecem algum sinal filogenético (Ward *et al.*, 2005; Valdez-Moreno *et al*., 2009). Isso significa que as

relações entre as espécies de um mesmo gênero ou as relações entre gêneros formam, em geral, grupos coesivos (Valdez-Moreno *et al*., 2009).

Na presente análise, um clado bem suportado (93%), formado pelas espécies do grupo *C. lauroi* e as espécies *C. pterostictum* e *C. lanei*, foi encontrado, não tendo sido possível recuperar a monofilia do grupo *C. lauroi*.

Esse clado contendo as espécies do grupo *C. lauroi*, mais *C. pterostictum* e *C. lanei* pode ser delineado pela presença de cromossomos sexuais diferenciados, como descritos no capítulo 1, mostrando que alguma relação entre as espécies pode ser recuperada quando se utiliza a metodologia do DNA *barcoding*.

Porém, para Ward *et al*. (2005), não se pode esperar que seja recuperada a verdadeira filogenia de peixes a partir de um fragmento de aproximadamente 655 pb de DNA mitocondrial, e os autores sugerem a utilização de regiões mitocondriais e nucleares complementares em análises futuras utilizando outros métodos de reconstrução filogenética, além do Neighbor Joining com a distância de Kimura-2-parâmetros, usado nas análises do COI, tais como máxima parcimônia e máxima verossimilhança.

O presente trabalho reforça a ideia de que a aplicação da metodologia do DNA *barcoding* deve ser utilizada com cautela, uma vez que possui limitações na identificação de espécies e/ou populações recentemente separadas, mas também mostra que as sequências do COI podem ser utilizadas na reconstrução da história de vida de um determinado grupo, como pode ser visto para as espécies do gênero *Characidium.*

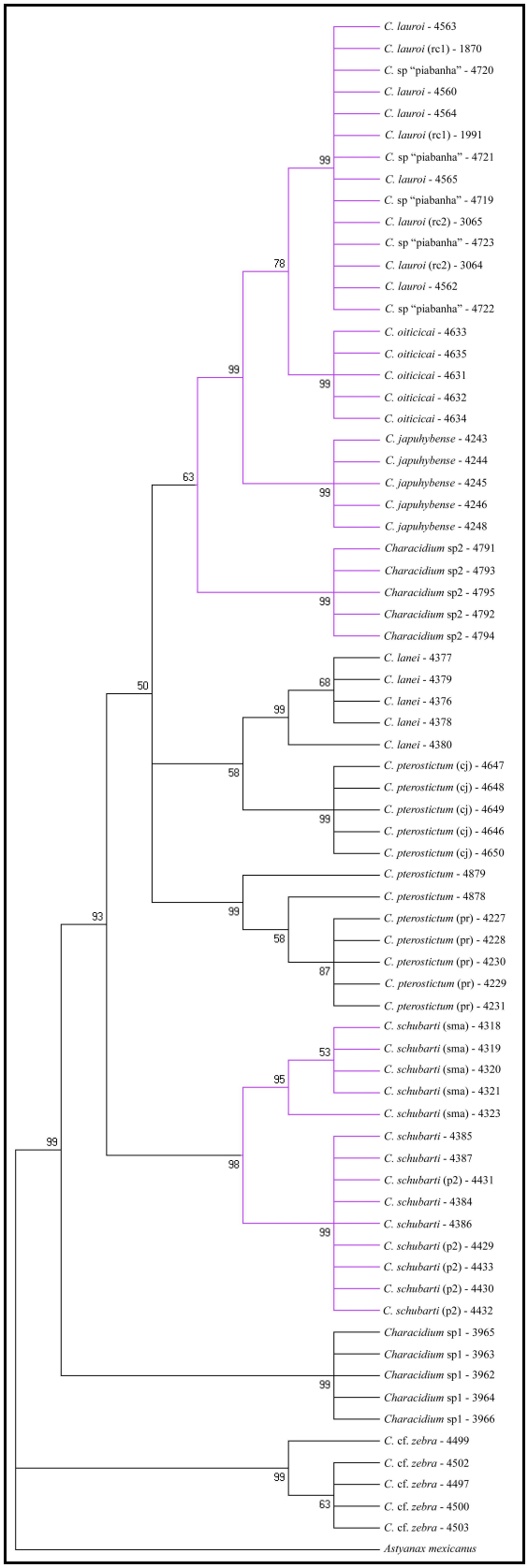


Figura 18: Reconstrução filogenética baseada em sequências do COI com todas as espécies do presente trabalho, mostrando valores de bootstrap acima de 50%. Ao lado do nome das espécies está relacionado o número de tombo do Lab. de Ictiogenética. Os ramos em destaque são das espécies pertencentes ao grupo *C. lauroi.*

Tabela 6: Divergência nucleotídica entre as espécies estudadas referente à Figura 18 (os números em destaque são citados na descrição dos resultados e discutidos posteriormente).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0.0058																
2	0.1589	0.0000															
3	0.1664	0.0649	0.0038														
4	0.1564	**0.0175**	0.0607	0.0000													
5	0.1564	**0.0175**	0.0607	**0.0000**	0.0000												
6	0.1564	**0.0175**	0.0607	**0.0000**	**0.0000**	0.0000											
7	0.1541	**0.0195**	0.0692	**0.0135**	**0.0135**	**0.0135**	0.0000										
8	0.1666	0.0419	0.0672	0.0524	0.0524	0.0524	0.0523	0.0058									
9	0.1416	0.0630	0.0563	0.0608	0.0608	0.0608	0.0694	**0.0630**	0.0000								
10	0.1641	0.0439	0.0694	0.0545	0.0545	0.0545	0.0544	**0.0077**	**0.0673**	0.0000							
11	0.1664	0.0587	0.0736	0.0651	0.0651	0.0651	0.0694	0.0459	0.0650	0.0459	0.0019						
12	0.1561	0.0608	0.0692	0.0630	0.0630	0.0630	0.0672	0.0480	0.0672	0.0480	**0.0155**	0.0000					
13	0.1561	0.0608	0.0692	0.0630	0.0630	0.0630	0.0672	0.0480	0.0672	0.0480	**0.0155**	**0.0000**	0.0000				
14	0.1564	**0.0175**	0.0607	**0.0000**	**0.0000**	**0.0000**	**0.0135**	0.0545	0.0608	0.0545	0.0673	0.0630	0.0630	0.0000			
15	0.1561	0.0439	0.0627	0.0418	0.0418	0.0418	0.0459	0.0439	0.0585	0.0480	0.0585	0.0564	0.0564	0.0418	0.0000		
16	0.1615	0.1049	0.1092	**0.1025**	0.1025	0.1025	0.1074	0.1049	0.1193	0.1049	0.0978	0.0842	0.0842	0.1025	0.1094	0.0000	
17	0.2155	0.2509	0.2372	0.2480	0.2480	0.2480	0.2506	0.2424	0.2286	0.2395	0.2310	0.2147	0.2147	0.2480	0.2398	0.2289	0.0000

Legenda: 1 – *C.* cf. *zebra*; 2 – *C. japuhybense*; 3 – *C. lanei*; 4 – *C. lauroi*; 5 – *C. lauroi* (rc1); 6 – *C. lauroi* (rc2); 7 – *C. oiticicai*; 8 – *C. pterostictum*; 9 – *C. pterostictum* (cj); 10 – *C. pterostictum* (pr); 11 – *C. schubarti* (sma); 12 – *C. schubarti* (p2); 13 – *C. schubarti*; 14 – *Characidium* sp. “piabanha”; 15 – *Characidium* sp.2; 16 – *Characidium* sp.1; 17 – *Astyanax mexicanus*.

Capítulo 3

Capítulo 3

Relações filogenéticas entre espécies do grupo *Characidium lauroi* (Characiformes, Crenuchidae), com base em sequências de genes mitocondriais.

Palavras-chave: grupo *C. lauroi*, sequenciamento, ATPase 6 e 8, Citocromo b.

Resumo

O grupo *Characidium lauroi* pertence ao gênero *Characidium* e é composto por seis espécies, que se distribuem nas bacias do Rio Paraíba do Sul, Rio Tietê, Rio Paranapanema, Rio Iguaçu e Drenagens Costeiras da Baía de Ilha Grande. Os estudos disponíveis sobre as relações evolutivas entre as espécies que compõem esse grupo baseiam-se em dados morfológicos. Esses dados, entretanto, não foram suficientes para resolver as relações entre *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. "iguaçu". O objetivo do presente trabalho foi analisar as relações filogenéticas das espécies do gênero *Characidium*, principalmente com enfoque nas relações entre as espécies do grupo *C. lauroi*. De acordo com os resultados obtidos, o grupo *C. lauroi* não forma um grupo monofilético dentro do gênero *Characidium*, o que pode indicar que essas espécies possam ter se separado recentemente de *C. pterostictum* e *C. lanei*. Comparações entre as topologias encontradas com base em dados morfológicos e moleculares foram feitas e suas implicações na delimitação desse grupo são discutidas.

Abstract

The group *Characidium lauroi* belongs to the genus *Characidium* and comprises six species, distributed in the basins of the Paraiba do Sul River, Tietê River, Paranapanema River, Iguaçu River and Coastal Drainages of the Bay of Ilha Grande. Available studies on the evolutionary relationships between species that make up this group are based on morphological data. These data, however, were not sufficient to address the relationship between *C. oiticicai*, *C. schubarti* and *Characidium* sp. "iguaçu". The aim of this study was to analyze the phylogenetic relationships of the genus *Characidium*, mainly focusing on the relationships between species of group *C. lauroi*. According to the results, group *C. lauroi* not form a monophyletic group within the genus *Characidium*, which may indicate that these species may have recently separated from *C. pterostictum* and *C. lanei*. Comparisons between the topologies found based on morphological and molecular data were made and their implications for the delimitation of this group are discussed.

Introdução

O gênero *Characidium* é composto por espécies de pequeno porte, que habitam pequenos córregos e riachos de cabeceiras de rios. Apesar de ser considerado o mais amplamente distribuído e rico da família Crenuchidae, esse gênero é considerado pouco conhecido, incluindo vários táxons ainda em processo de descrição (Buckup, 1993b). A principal razão dessa lacuna está na dificuldade de reconhecer as espécies, já que a maior parte das descrições foi realizada de maneira precária há mais de meio século, sendo que apenas espécies capturadas em suas localidades-tipo podem ser seguramente identificadas, e a maioria das identificações requer consultas às descrições originais (Melo, 2001).

Poucos estudos foram realizados com o objetivo de resolver as relações evolutivas entre as espécies desse gênero. Esses estudos, baseados apenas em caracteres morfológicos, foram relacionados à formação de grupos dentro gênero (Buckup e Hahn, 2000; Melo, 2001). O grupo *Characidium lauroi*, primeiramente descrito por Travassos (1967), composto atualmente por seis espécies (*C. lauroi, C. japuhybense, C. oiticicai, C. schubarti*, *Characidium* sp. “piabanha” e *Characidium* sp. “iguaçu”) teve suas relações evolutivas analisadas, porém os dados morfológicos não foram suficientes para resolver as relações entre essas espécies, como pode ser visto na Figura 3 (introdução) (Melo, 2001).

O uso de seqüencias de DNA de populações naturais de peixes tem se mostrado uma ferramenta importante no campo da sistemática molecular para a inferência de relações filogenéticas (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Ortí *et al.*, 1996; Calcagnotto *et al*., 2005, Pretti *et al*., 2009), além de contribuir com estudos que visam à conservação de espécies (Wolfe e Liston, 1998).

Apesar de ser amplamente utilizado em peixes, o sequenciamento de DNA não foi ainda usado para identificar relações filogenéticas entre espécies do gênero *Characidium*, principalmente com relação às espécies do grupo *C. lauroi*, tornando-se esse o objetivo do presente trabalho.

Materiais e Métodos

Para as análises de sequenciamento de DNA, foram utilizados dois indivíduos de cada população amostrada (*C. lauroi, C. japuhybense, C. oiticicai, C. schubarti, Characidium* sp. "piabanha", *Characidium* sp.1, *Characidium* sp.2, *Characidium* cf. *zebra, C. pterostictum* e *C. lanei*) como pode ser visto na Tabela 2 (materiais e métodos). A espécie *Astyanax mexicanus* foi usada como grupo externo para polarizar as árvores geradas nessa análise e suas sequências foram obtidas no GenBank. Para a obtenção das regiões mitocondriais de interesse, amostras de tecido (fígado, músculo ou nadadeira), preservadas em etanol absoluto foram utilizadas para a extração de DNA genômico total, seguindo o protocolo de extração salina (Aljanabi e Martinez, 1997).

Para as reações de amplificação foram utilizados, para o gene ATPase, o par de primers ATP8.2-L8331 (5' – AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC – 3') e CO3.2-H9236 (5' – GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C – 3') (Sivasundar et *al*., 2001) e, para o gene Citocromo b, o par de *primers* GluDG.L (5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG-3') e H16460 (5'-CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G-3') (Perdices *et al*., 2002).

Cada reação de PCR apresentou o volume final de 25 µl, contendo, 1 µl de DNA molde [20ng/mL]; 1 µl de cada *primer* [10pM]; 1,5 µl de $MgCl_2$ [25mM]; 2,5 µl de tampão [10x]; 2,50 µl de dNTP [10m M]; 0,25 µl [5U] de Taq polimerase –

Fermentas; 15,25 µl de água destilada. As reações foram realizadas em termociclador PTC 110 Programmable Thermal Controller – MJ Research e as condições da PCR foram as seguintes: 94ºC (4 min), 10 ciclos de 92°C (0,5 min), 50°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), 40 ciclos de 92°C (0,5 min), 53°C (0,5 min), 72°C (1,5 min), seguidos de um período de extensão final de 10 min a 72°C e um período de resfriamento a 4°C.

A verificação de amplificação foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, com 4,0 µl de amostra, mais 1,0 µl de azul de bromofenol, com *ladder* de 1 kb para verificação do tamanho do fragmento amplificado, e visualizado em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak).

Para realização da reação de sequenciamento utilizou-se o kit "BigDye Sequence Terminator v.3.1" (Applied Biosystems), seguindo as orientações do fabricante. As condições de amplificação foram: 25 ciclos a 96ºC por 30 segundos; 15 segundos a 50ºC; 4 minutos a 60ºC. Após término do ciclo de Big Dye, os produtos foram precipitados e seqüenciados (seqüenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI).

As sequências obtidas foram visualizadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e, para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAmt, utilizou-se o algoritmo Clustal W v1.6 (Thompson *et al*., 1994) pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), aplicando-se penalidades para os alinhamentos par-a-par e múltiplos para abertura (10) e extensão de *gaps* (0,2). Para verificação do alinhamento, foi visualizado o quadro de leitura das sequências por meio do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007), uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros. As sequências foram verificadas no GenBank

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov) por meio do programa “BlastN”, que investiga a similaridade destas com sequências de DNAmt de outros peixes.

Para verificação da ocorrência de saturação nos genes, foi utilizado o programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), que possibilitou a construção de gráficos que demonstram a quantidade de transições (TS) e transversões (TV) com relação à distância genética entre os táxons.

As análises filogenéticas foram realizadas, inicialmente, com as regiões gênicas separadas (Anexo 2) e, em seguida, com as sequências concatenadas. Para a construção de dendrogramas com base no algoritmo de agrupamento de vizinhos “Neighbor Joining”- NJ (Saitou e Nei, 1987) foi utilizado o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007) com o modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) que considera as diferenças entre as taxas de transição e transversões, assim como as diferenças quanto ao conteúdo de bases CG. Testes de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) de 1000 replicações foram efetuados para a árvore NJ construída, sendo que os valores inferiores a 50% foram desconsiderados.

As análises baseadas no método de Máxima Parcimônia (MP) foram efetuadas por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com algoritmo “tree bisection and reconnection” (TBR), sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Foram calculados os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência rescalonado (ICR) por meio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). O programa TreeRot 2.0 (Sorenson, 1999) foi empregado para a obtenção do índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994). A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado foi realizada pelo programa MODELTEST 3.0 e este foi utilizado para estimar a distância genética entre os grupos estudados (Posada e Crandall,

1998). Para a determinação dos valores de *bootstrap* foram utilizadas 1000 replicações, com retenção de grupos com freqüência maior que 50%.

Em todas as análises, os valores de *bootstrap* entre 50-70 foram considerados fracos, entre 70-90 bons e iguais ou superiores a 90, fortes.

Resultados

Foram seqüenciados dois genes mitocondriais para todas as espécies estudadas, totalizando 40 indivíduos seqüenciados, distribuídos em 10 espécies (Tabela 3 – materiais e métodos).

Em uma tentativa de diminuir o ruído causado pela presença de 40 terminais nas análises, foi utilizado um consenso das sequências de indivíduos pertencentes a uma mesma população utilizando-se as notações para bases degeneradas (a fim de não perder a variabilidade nucleotídica da população), reduzindo o número de terminais para 13, com o grupo externo.

A caracterização da informação filogenética contida em cada um dos genes mitocondriais empregados no presente estudo encontra-se disponível na Tabela 7. Nenhum dos genes apresentou códons de parada quando traduzidos em sequências de aminoácidos. A verificação do grau de saturação, obtida pela curva de substituição por meio da plotagem do número de transições e transversões versus a distância genética, não evidenciou saturação para os genes ATPase 6 e 8, Citocromo b e para todas as sequências concatenadas (Figura 19).

Nas análises realizadas no presente trabalho, as árvores de NJ e MP (Figuras 20 e 21) apresentaram, essencialmente, a mesma relação entre os táxons, entretanto, as relações de parentesco recuperadas entre alguns clados foram distintas, dependendo do

método de reconstrução empregado. O grupo externo, com *Astyanax mexicanus*, pertencente à família Characidae mantive-se na base da árvore.

Todas as espécies estudadas no presente trabalho, *C. lauroi, C. japuhybense, C. oiticicai, C. schubarti, Characidium* sp. “piabanha”, *Characidium* sp.1, *Characidium* sp.2, *C. pterostictum* e *C. lanei*, foram encontradas dentro de um único clado com alto suporte para o NJ e MP (99% e 98% - 27, respectivamente).

Dentro desse clado, *Characidium* cf. *zebra* foi encontrado como espécie basal para o gênero e, *C. lauroi* e *Characidium* sp. “piabanha” foram sempre recuperadas juntas, com suporte alto (100% e 14), assim como a relação de proximidade dessas espécies com *C. oiticicai* e *C. japuhybense* (NJ = 100%, MP = 89% - 5).

As duas populações de *C. schubarti* (*C. schubarti* e *C. schubarti* (sma)) foram recuperadas juntas com alto suporte (100% e 21) para os dois métodos de reconstrução utilizados. Já a espécie *C. pterostictum* também apresentou as duas populações analisadas recuperadas juntas, porém com suporte baixo a moderado (NJ = 73%, MP = 57% - 2).

As relações entre os clados de *C. schubarti, C. pterostictum* e aquele com *C. lauroi, Characidium* sp. “piabanha”, *C. japuhybense* e *C. oiticicai* com as demais espécies estudadas foram divergentes dependendo do método de reconstrução utilizado.

Para a árvore de NJ (Figura 20), as espécies *C. schubarti*, *C. lanei* e *Characidium* sp.2 formaram um clado com suporte baixo de 68%; no entanto, a relação dessas espécies com as demais espécies estudadas não foi obtida, sendo visualizada como uma politomia na árvore.

Para a árvore de MP (Figura 21), a relação entre o clado de *C. lauroi, Characidium* sp. “piabanha”, *C. japuhybense* e *C. oiticicai* com as demais espécies estudadas foi recuperada, no entanto, com valores se suporte baixos. A espécie

Characidium sp.1 foi encontrada sempre como uma espécie basal às demais espécies analisadas, assim como *Characidium* cf. *zebra*.

Discussão

O presente trabalho constitui o primeiro estudo filogenético baseado em genes mitocondriais para o gênero *Characidium*, além de apresentar um enfoque na análise das relações evolutivas de um determinado grupo de espécies proposto com base em caracteres morfológicos para o gênero.

As espécies do grupo *Characidium lauroi* tiveram as suas relações estabelecidas com base em dados morfológicos, porém esses dados não foram suficientes para esclarecer as relações entre *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium* sp. "iguaçu" (Melo, 2001). Os dados obtidos no presente trabalho, no entanto, não foram suficientes também para visualizar as relações entre as espécies desse grupo, mostrando uma politomia entre essas e as espécies *C. pterostictum* e *C. lanei*. A espécie *Characidium* sp. "iguaçu", utilizada na topologia de Melo (2001) não foi analisada no presente estudo, porém, uma nova espécie para o grupo *C. lauroi* está sendo descrita, *Characidium* sp.2.

Em relação às topologias encontradas pelos métodos de NJ e MP, essas foram bastante semelhantes às árvores encontradas com o uso de DNA *barcoding* (capítulo 2), divergindo em alguns pontos. As divergências encontradas em relação a essa árvore podem ser explicadas pelo fato de que essa metodologia apresenta dificuldades de estabelecer as reais relações evolutivas de um grupo de espécies com radiação recente, como discutido no capítulo 2.

Melo (2001) propôs que a posição de *C. japuhybense* como espécie basal dentro do grupo poderia ser corroborada pela relação de proximidade entre as demais espécies

do grupo, que ocorrem nas bacias do Rio Tietê, Paraíba do Sul, Ribeira do Iguape e Rio Iguaçu, e que essa relação poderia demonstrar que as cabeceiras do Paranapanema, Iguaçu e Ribeira do Iguape também faziam parte de um sistema comum ao alto Paraíba do Sul/Tietê.

Das hipóteses propostas por Melo (2001) para a resolução da árvore para as espécies restritas a essas bacias, essas revelam que, ou o isolamento das cabeceiras do Iguaçu é o evento mais antigo em relação à separação do Paranapanema, Tietê e Ribeira do Iguape, ou que as cabeceiras do Paranapanema teriam se separado primeiro, deixando unidas as cabeceiras do Iguaçu com Tietê, através do Ribeira do Iguape.

Como as espécies *C. pterostictum* e *C. lanei* do presente trabalho foram coletadas na Bacia do Ribeira do Iguape, a segunda hipótese proposta pelo autor poderia explicar o polifiletismo encontrado entre as espécies do grupo *C. lauroi* com essas outras espécies, indicando que essas possuem uma historia evolutiva muito próxima.

No entanto, a espécie *C. japuhybense* foi recuperada relacionando-se com *C. oiticicai* e *C. lauroi*, em um clado bem suportado. As espécies desse clado pertencem às bacias do Rio Paraíba do sul, Rio Tietê e Drenagens Costeiras da Baía de Ilha Grande. A formação desse clado indica que as espécies que ocorrem nessas bacias são mais proximamente relacionadas entre si do que com espécies das outras bacias hidrográficas.

A relação entre *Characidium* sp. “piabanha” e *C. lauroi*, recuperada em todas as topologias do presente trabalho, incluindo a topologia de PCR-RFLP (capítulo 1) e do DNA *barcoding* (capítulo 2), pode indicar que essas duas espécies formem, na verdade, uma única espécie, *C. lauroi*, de ocorrência exclusiva nos riachos da bacia do Rio Paraíba do Sul. Como a descrição dessas duas espécies foi baseada no pressuposto de que as suas populações ancestrais teriam se separado após o aumento do volume do rio

Paraíba do Sul, um evento recente que não teria permitido ainda que diferenças morfológicas marcantes se fixassem (Melo, 2001), a ideia de que elas formem uma única unidade genética parece ser bastante plausível.

Segundo Funk e Omland (2003), espécies que têm fluxo gênico cessado podem não compartilhar mais haplótipos ao longo do tempo, embora ainda apresentem haplótipos muito próximos, que se agrupam na árvore filogenética. Com isso, a relação de proximidade entre *C. lauroi*, *C. japuhybense* e *C. oiticicai* indica que os eventos de separação das cabeceiras das bacias do Rio Paraíba do Sul, Tietê e dos pequenos riachos da Baia de Ilha Grande podem ter sido os responsáveis pelos eventos de especiação que originaram essas espécies, resultando nas suas atuais distribuições geográficas.

Os resultados encontrados para as espécies do grupo *C. lauroi*, juntamente com a sua distribuição geográfica, podem indicar que cada espécie do grupo pertence a uma bacia hidrográfica distinta e que os eventos de separação dessas bacias resultaram em um evento de especiação independente entre eles, uma vez que essas espécies formam populações pequenas e isoladas em cabeceiras de riachos (Buckup, 1993b).

Funk e Omland (2003) ressaltaram que mesmo o DNAmt pode exibir variação insuficiente para a reconstrução de grupos com radiação filogenética muito recente, gerando artefatos. Por outro lado, regiões que evoluem muito rapidamente podem estar saturadas e produzir árvores com alto grau de homoplasias. Segundo esses autores, dependendo dos valores da medida de suporte (*bootstrap*, por exemplo), situações de polifiletismo podem refletir a árvore real para o gene mitocondrial utilizado, e não um simples artefato causado por dados inadequados.

Entretanto, não são apenas regiões gênicas inadequadas para a análise da evolução molecular de determinado grupo que geram árvores polifiléticas. Espécies crípticas ou com identificação taxonômica confusa representam potencialmente um

problema na resolução de árvores evolutivas, levando a polifilia (Funk e Omland, 2003).

Embora o grupo *C. lauroi* tenha sido delimitado com base em caracteres morfológicos, os dados citogenéticos encontrados no presente trabalho (capítulo 1) para as espécies do grupo *C. lauroi* indicam que essas características, como a presença de cromossomos sexuais diferenciados e predomínio de cromossomos do tipo m/sm não são restritas a esse grupo, incluindo *C. pterostictum*, *C. lanei* e algumas populações de *C. gomesi*.

Essas espécies, com exceção de *C. gomesi* (não estudada aqui) formam um clado com suporte elevado em ambas às análises utilizadas (NJ = 99%, MP = 98% - 27), mostrando que provavelmente *C. pterostictum* e *C. lanei* possuem alguma relação com as espécies do grupo *C. lauroi*, apresentando radiação recente em relação a elas, mas que não fazem parte do grupo *C. lauroi*, por não apresentarem características morfológicas que pudessem agrupá-las a esse grupo de espécies (Buckup, comunicação pessoal).

A politomia encontrada no presente trabalho é, provavelmente, resultado do curto tempo de divergência entre os táxons analisados, uma vez que os efeitos de saturação nos genes utilizados foram descartados.

A abordagem utilizada no presente trabalho utiliza-se da vantagem de empregar uma análise combinada de diferentes genes. Este tipo de abordagem vem se mostrando útil em estudos que buscam esclarecer as relações filogenéticas dentro de um grupo (Pellegrino *et al*., 2001; Hardman, 2004; Calcagnotto *et al*., 2005; Simabukuro-Dias *et al*., 2004; Pretti *et al*., 2009), uma vez que o poder de uma análise conjunta reside no fato de que cada partição pode apresentar taxas evolutivas diferentes, atuando na resolução de problemáticas em diferentes níveis hierárquicos (Hills, 1987). A falta de

resolução de algumas topologias resultantes do emprego de genes individuais, também pode ser resolvida quando outros genes são incorporados à análise, uma vez que o ruído observado nas análises individuais pode então ser dissipado na análise conjunta (Queiroz *et al*., 1995).

Pelo fato de que o grupo *C. lauroi* tenha se mostrado não monofilético, sugere-se o aumento no número de espécies nas análises do gênero *Characidium*. Além disso, a inclusão de diferentes grupos externos pode mudar consideravelmente a relação apresentada entre as espécies estudadas do gênero *Characidium*, alterando a topologia da árvore evolutiva, podendo refutar ou corrobarar a presença desse grupo de espécies. Ainda, em vista da recente divergência do grupo, torna-se recomendável a utilização de outros marcadores mitocondriais e nucleares, que poderiam fortalecer os valores de *bootstrap* dos ramos, sobretudo nos táxons que apresentam maior proximidade genética.

Tabela 7: Caracterização da informação filogenética contida em cada um dos genes mitocondriais empregados no presente estudo.

	ATPase	**Cit b**	**Regiões Concatenadas**
Nº total de sítios	748	1060	1808
Nº de sítios conservados	451	687	1138
Nº de sítios informativos para parcimônia	150	211	361
Composição nucleotídica			
% G	11,8	13,7	12,9
% A	30,0	27,1	28,3
% T	31,2	30,9	31,0
% C	27,0	28,3	27,8
Razão Ti/Tv	2,238	3,499	2,919
Nº de árvores obtidas	2	1	1
Nº de passos	499	726	1229
IC	0,735	0,653	0,684
IR	0,549	0,484	0,503
ICR	0,404	0,316	0,344

Legenda: Ti – transições; Tv – transversões; IC – índice de consistência; IR – índice de retenção; ICR – índice de consistência rescalonado.

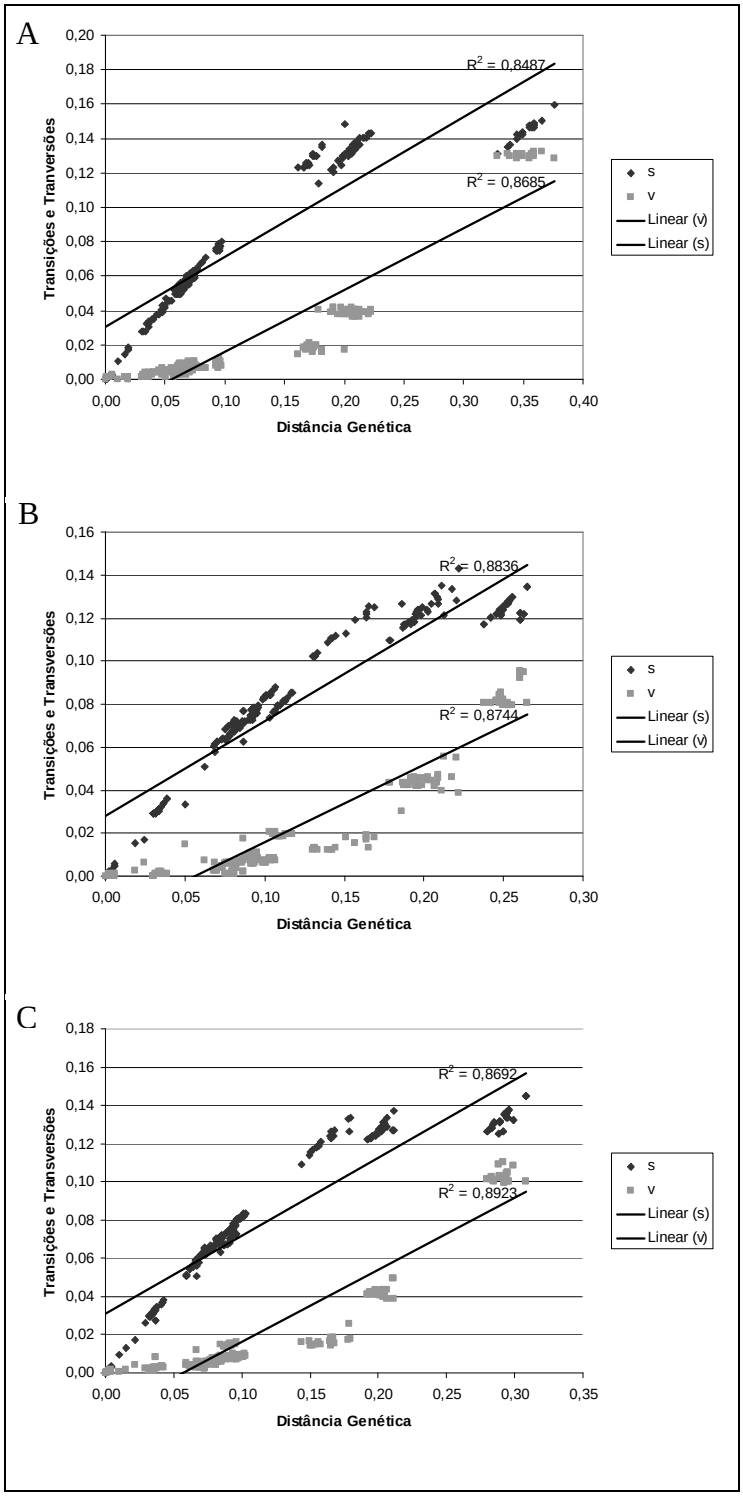


Figura 19: Gráficos da freqüência observada de transições (S) e transversões (V) *versus* a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para os genes (A) ATPase 6 e 8, (B) Citocromo b, (C) todas as regiões gênicas concatenadas.

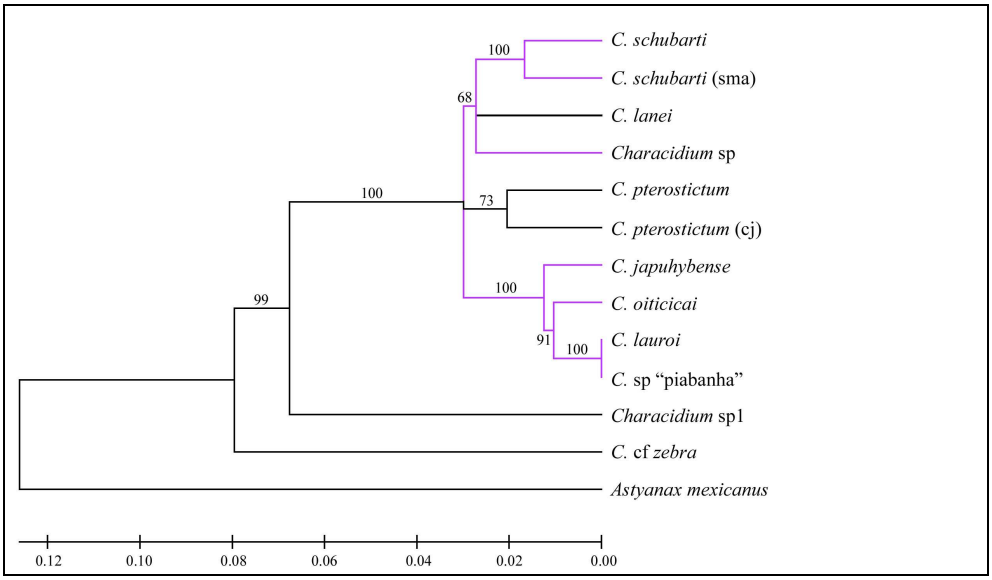


Figura 20: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas, de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.

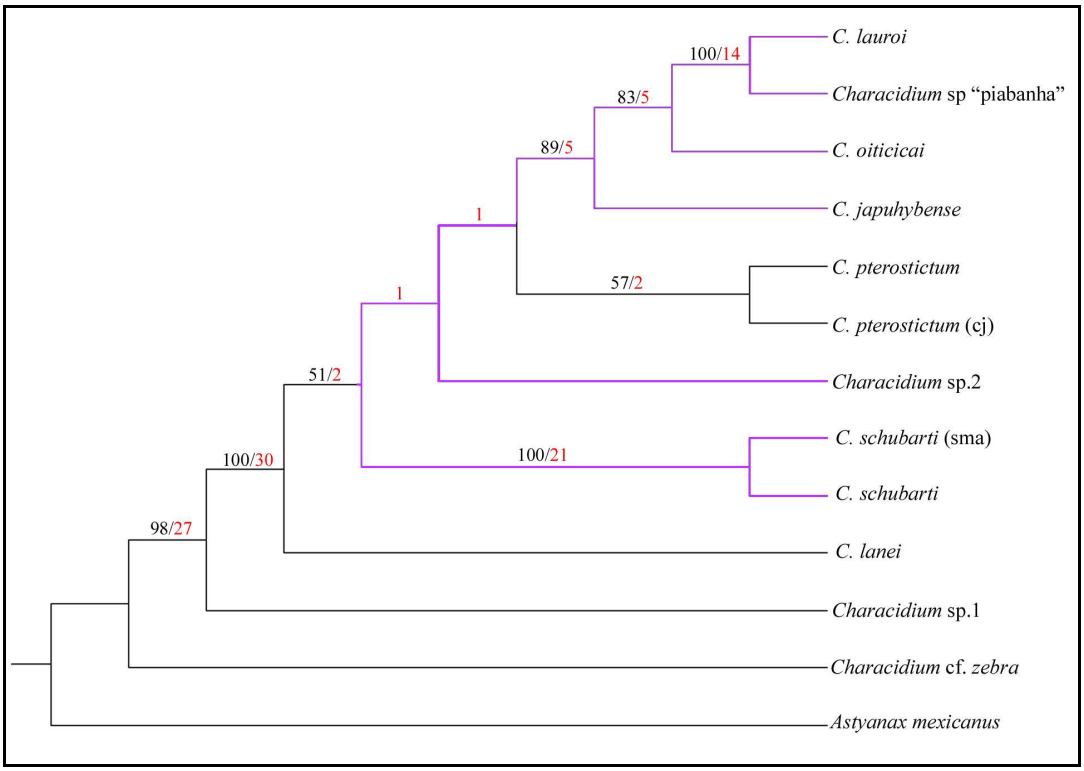


Figura 21: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia, com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas, de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores em preto correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas e os valores em vermelho, aos índices de Bremer.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

No presente estudo, foram analisadas as relações evolutivas entre as espécies do grupo *C. lauroi*, tanto com base em caracteres cromossômicos, como em dados de seqüencias de regiões do genoma mitocondrial, incluindo sequências do DNA *barcoding*.

Com relação ao grupo *Characidium lauroi*, estudos citogenéticos foram já realizados em algumas espécies, porém com caráter descritivo, não tendo sido discutida a formação do grupo e suas relações evolutivas; os estudos disponíveis são baseados em dados morfológicos que não foram suficientes para estabelecer as relações entre essas espécies.

No presente trabalho, as informações citogenéticas e moleculares foram associadas, chegando-se às seguintes conclusões:

- O grupo *Characidium lauroi* não forma um grupo monofilético e as relações entre as espécies que o compõem não são definidas.
- As espécies e/ou populações do grupo *C. lauroi* analisadas no presente trabalho compartilham características citogenéticas, porém isso é compartilhado com outras espécies do gênero.
- A técnica de PCR-RFLP aplicada às espécies do grupo *C. lauroi* mostrou limitações quando comparada às topologias obtidas por meio de sequenciamento do DNA, porém mostrou-se eficiente em avaliar a diversidade populacional de cada espécie, cada uma apresentando um único haplótipo conjugado, resultado esse corroborado pelo uso das sequências do DNA *barcoding*.

- O uso do DNA *barcoding* nas espécies do gênero *Characidium* revelou a dificuldade dessa sequência em diferenciar espécies recentemente irradiadas, como *C. lauroi*, *C. oiticicai* e *C. japuhybense*, espécies essas bem definidas morfologicamente, mostrando-se, porém, bastante eficiente para detectar divergências intra-populacionais.
- O grupo *C. lauroi*, quando analisado em conjunto com outras espécies do gênero, não se apresenta monofilético, encontrando-se polifilético com as espécies *C. pterostictum* e *C. lanei*. O clado formado por essas espécies apresenta um suporte forte em todas as topologias analisadas e a presença de cromossomos sexuais diferenciados em todas as espécies que compõem esse clado corrobora a proposta de que esses cromossomos tenham uma origem única, restrita a um grupo de espécies do gênero *Characidium* (Centofante *et al*., 2001, 2003; Vicari *et al*., 2008; Alves, *et al*., 2010), do qual o grupo *C. lauroi* faz parte.
- A espécie *Characidium* sp. "piabanha" mostrou-se muito semelhante a *C. lauroi* e, levando-se em consideração os dados morfológicos, pode-se dizer que essas duas entidades formam uma única espécie, distribuída nas drenagens da Bacia do Rio Paraíba do Sul.
- A descrição de mais uma espécie relacioanda às espécies do grupo *C. lauroi*, *Characidium* sp1, não altera o número de espécies pertencentes a esse possível grupo, considerando-se a união de *C. lauroi* e *Characidium* sp. "piabanha".
- Como o gênero *Characidium* é considerado o mais rico e especioso da família Crenuchidae, a inclusão de novas espécies e novas regiões gênicas nas análises pode possivelmente alterar as relações evolutivas encontradas, podendo, dessa forma, comprovar ou refutar o monofiletismo do grupo *C. lauroi*.

Referências Bibliográficas

Agnése, J.F.; Teugels, G.G.; Galbusera, P.; Guyomard, R.; Volckaert, F. (1997). Morphometric and genetic characterization of sympatric populations of *Clarias gariepinus* and *C.anguillaris* from Senegal. **J. Fish Biol. 50**: 1143-1157.

Aljanabi SM, Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-pased techniques. **Nucleic Acids Res** 25:4692-4693.

Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. e Toledo-Filho, A.S. (1984). Complex sex chromosome system in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae). **Genome** 64: 165-169.

Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. e Toledo-Filho, A.S. (2000). Karyotypic evolution in neotropical freshwater fish. **Chromosome Today** 13: 169-182.

Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Pequignot, E.V.; Daniel-Silva, M.F.Z. (2001). XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the neotropic electric eel Eigenmannia virescens. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, Suíça, 95:73-78.

Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A. e Foresti, F. (2006). Karyotypic elationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with escription of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. 128:1-9.

Alves, J.C.P. (2006). Estudos citogenéticos em espécies de *Characidium* (Pisces-Characiformes) que apresentam sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. Dissertação de Mestrado apresentado à UNESP.

Alves, J.C.P.; Paiva, L.R.S.; Oliveira, C. e Foresti, F. (2010). Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotrop. Ichthyol** 8(1):77-86.

Alves-Gomes, J.A.; Ortí, G.; Haygood, M.; Heiligenberg, W. e Meyer, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American Electric Fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. **Mol Biol Evol** 12: 298-318.

Amemiyta, C.T. e Gold, J.R. (1988). Cromomycin A_3 stains nucleolar organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, p. 226-231.

Andreata, A.A., Oliveira, C., Fausto, F. (2006). Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct brazilian river basins. **Genetics and Molecular Biology**. 29: 62-66.

Aranishi, F.; Okimoto, T. e Izumi, S. (2005). Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. **Journal of Applied Genetics**, 46, 69–73.

Artoni, R.F. (1999). Citogenética dos sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero Triportheus (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. São Carlos, 162 pp.

Artoni, R.F. e Bertollo, L.A.C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas** 134: 201-210.

Avise, J. C. (1975). Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology** 23, 465–481.

Avise, J.C.; Lansman, R.A. e Shade,R.O. (1979a). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetica**, 92:279-295.

Avise, J.C.; Giblin-Davidson, C.; Laerm, J.; Patton, J.C. e Lansman, R.A. (1979b). Mitochondrial DNA clones and populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proceeding of the National Academy of Sciences** USA, 76:6694-6698.

Avise, J.C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Phill. Trans Roy Soc London** 312: 325-342.

Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. e Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeografy: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst**. 18: 489-522.

Avise, J.C. (1991). Ten unorthox perpectives on evolution prompt by comparative population genetic finding on mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Genet**. 25:45-69.

Avise, J. C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York, NY.

Ballard, W.O. e Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. **Mol. Eco**., 13:729-744.

Bartlett, S. E. e Davidson, W. S. (1991). Identification of *Thunnus tuna* species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science** 48, 309–317.

Bartlett, S. E. e Davidson, W. S. (1992). FINS (forensically important nucleotide sequences): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. **Biotechniques:** 12, 408–411.

Beheregaray, L.B. e Sunnucks, P. (2001). Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Mol Ecol** 10: 2849-2866.

Beheregaray, L.B.; Ciofi, C.; Caccone, A.; Gibbs, J.P. e Powell, J.R. (2003). Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzón, Galápagos Islands. **Conserv Genet** 4: 31-46.

Bermingham, E. e Avise, J.C. (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics,** 113:939-965.

Bermingham, E. e Martin, A.P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes; testing shared history to infer the evolutionary landscape of Lower Central America. **Mol Ecol** 7: 449-517.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. e Moreora-Filho, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil. J. Genet**., 2: 17-37.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S. e Moreora-Filho, O. (1983). Multiple sex chromosome in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, 48: 1-12.

Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S. e Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res**. 2000; 8: 603-613.

Born, G.G. e Bertollo, L.A.C. (2000). An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with polymorphic NOR bearing X chromosome. **Chrom Res** 8: 111-118.

Bremer, K. (1994). Branch support and tree stability. **Cladistics** 10: 295-304.

Brown, W.M.; George, M.Jr e Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 76:1967–1971.

Buckup, P.A. (1993a). Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiinin fishes (Characiformes, Ostariophysi). **Cladistics** 9:305-341.

Buckup, P.A. (1993b). The monophyly of Characidiinae, a neotropical group of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysi). **Zool. J. Linn. Soc.** 108:225-245.

Buckup, P.A. e Reis, R.E. (1997). Characidiin genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in Southern Brazil, with description of three new species. **Copeia**, 3:531-548.

Buckup, P. A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). – In: Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P. *et al*. (eds), **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 123–144.

Buckup, P.A.; Zamprogno, C.; Vieria, F. e Teixeira, R.L. (2000). Waterfall climbing in *Characidium* (Crenuchidae, Characidiinae) from eastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, Munique, 11(3):273-278.

Buckup, P.A. e Hahn, L. (2000). *Characidium vestigipinne*: a new species of Characidiinae (Teleostei, Charaiformes) from Southern Brazil. **Copeia**, 1:150-155.

Buckup, P.A. (2003). Family Crenuchidae (South American Darters). *In*: Reis R, Kullander ESO, Ferraris Jr CJ editors. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs. p 87-95.

Calcagnotto, D.; Schaefer, S.A. e DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol Phylogenet Evol** 36: 135-153.

Caramashi, E.P. (1986). Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 245p.

Carew, M. E.; Pettigrove, V.; Cox, R. L. e Hoffmann, A. A. (2007). DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera: Chironomidae). **Journal of the North American Benthological Society** 26, 587–600.

Centofante, L.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho,O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**. 54:253-260.

Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Buckup, P.A. e Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas.** 138: 213-218.

Chantangsi, C.; Lynn, D.H.; Brandl, M.T.; Cole, J.C.; Hetrick, N. e Ikonomi, P. (2007). Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57, 2412–2425.

Clare, E.L.; Lim, B.K.; Engstrom, M.D.; Eger, J.L. e Hebert, P.D.N. (2007). DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes** 7, 184–190.

Cole, C.J. e Leavens, C.R. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved techique. **Herpetol. Rev**. 3: 102.

Cooper, J.K.; Sykes, G.; King, S.; Cottrill, K.; Ivanova, N.V.; Hanner, R. e Ikonomi, P. (2007). Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. In: Vitro Cellular & Developmental Biology. **Animal** 43, 344–351

Costa, F.O.; deWaard, J.R.; Boutillier, J.; Ratnasingham, S.; Dooh, R.T.; Hajibabaei, M. e Hebert, P.D.N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 64, 272–295.

Cywinska, A.; Hunter, F.F. e Hebert, P.D.N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology** 20, 413–424.

Danzmann, R.G. e Ihssem, P.E. (1995). A phylogeograhic survey of brook char (*Salvelinus fontinalis*) in Algonquin Park, Ontario based upon mitochondrial DNA variation. **Mol Ecol**., 4(6): 681-697.

Diniz, D.; Laudicina, A.; Cioffi, M.B. e Bertollo, L.A.C. (2008). Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenet Genome Res**.; 122:163-168.

Dowling, T.E.; Moritz, C.; Palmer, J.D. e Rieseberg, L.H. (1996) Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites. **Molecular Systematics** (eds: Hills, D.M.; Moritz, C.; Mable, B.K) Canada, 249-319.

Ekrem, T.; Willassen, E. e Stur, E. (2007). A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. **Mol Phylogenet Evol** 43, 530–542.

Elias, M.; Hill, R.I.; Willmott, K.R.; Dasmahapatra, K.K.; Brower, A.V. Z.; Mallet, J. e Jiggins, C.D. (2007). Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proceedings of the Royal Society** B 274, 2881–2889.

Erpenbeck, D.; Hooper, J.N.A. e Worheide, G. (2006). COI phylogenies in diploblasts and the "Barcoding of Life" – are we sequencing a suboptimal partition? **Molecular Ecology Notes** 6, 550–553.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791.

Fenochio, A.S. e Bertollo, A.C. (1990). Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genética**, 81: 193-198.

Ferro, D.A.M.; Neo, D.M.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. **Genetica** 110:55-62.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. e Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5, 294–299.

Foottit, R.G.; Lowery, D.T.; Maw, H.E.L.; Smirle, M.J. e Lushai, G. (2009). Identification, distribution and molecular characterization of the apple aphids, *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae). **Can. Entomol**. 141: 478-495.

Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. e Toledo-Filho, S.A. (1989). Supranumeray chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**., v. 79, p. 107-114.

France, S.C. e Hoover, I.L. (2002). DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). **Hydrobiology** 471, 149–155.

Fujiwara, A.M.; Abe, S.; Yamaha, E.; Yamazaki, F. e Yoshida, M.C. (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver stained nuclear organizer regions in salmonid fishes. **Chromosome Research.**; 6:463-471.

Funk, D.J. e Omland, K.E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly**:** Frequency, Causes, and Consequences, with insights from Animal Mitochondrial DNA. **Annu Rev Ecol Evol Syst** 34:397–423.

Galetti Jr., P.M.; Mestriner, C.A.; Mônaco, P.J. e Rasch, E.M. (1995). Postzygotic modofications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variants in fish: reporto f a case involving *Leporinus fridereci*. **Chromos. Res**. 3: 285-290.

Galetti Jr., P.M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool**. 65 (Suppl.): 53-55.

Garcez, R. (2006). Análise da estrutura genética populacional do curimbatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do rio Grande, SP. Dissertação de Mestrado USP, Brasil.

Garcia, C.; Oliveira, C. e Almeida-Toledo, L.F. (2010). Karyotypic evolution trends in **Rhamdia quelen** (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research,** 9:365-384.

Garesse, R.; Carrodeguas, J.A.; Santiago, J.; Perez, M.L.; Marco, R., Vallej, C.G. (1997) Artemia mithocondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. **Comp Biochem Phisiol** 117: 357-366.

Géry, J. (1977). **Characoids of the world**. T.F.H. Publications Inc, Neptune City, 672 pp.

Gold, J.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S e Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of methaphase chromosome banding. **J. Fish. Biol.**., 37: 563-575.

Gornung, E.; Cordisco, C.A.; Rossi, A.R.; De Innocentiis. S.; Crosetti, D. e Sola, L. (2001). Chromosomal evolution in Mugilidae: karyotype characterization of *Liza saliens* and comparative localization of major and minor ribosomal genes in the six Mediterranean mullets. **Marine Biol**. 139:55–60.

Greenwood, P.H.; Rosen, D.E.; Weitzman, S.H. e Myers, G.S. (1966). Phylogenetic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.** 131: 339-456.

Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. e Hebert, P.D.N. (2006a). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 103, 968–971.

Hajibabaei, M.; Singer, G.A.C.; Hebert, P.D.N. e Hickey, D.A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics** 23, 167–172.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser** 41: 95-98.

Hanner, R. e Gregory, T.R. (2007). Genomic diversity research and the role of biorepositories. **Cell Preservation Technology** 5, 93–103.

Hansen, M.M; Ruzzate, D.E; Nielsen, E.E. e Mensberg, K.L.D. (2000). Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta*). **Mol. Ecol**., 9(5): 583-594.

Hardman, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfihes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activating gene 2. **Mol Phylogenet Evol** 30: 395-408.

Harris, J.D. (2003). Can you bank on GenBank? **Trends in Ecology and Evolution** 18, 317–319.

Harrison, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends Ecol. Evol**. 4: 6-11.

Hashimoto, D.T.; Mendonça, F.F.; Senhorini, J.A.; Bortolozzi, J.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2010). Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**, 298:346-349.

Hatanaka, T. e Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S RNA genes in the fish *Prochilodus argentus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239-244.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. e de Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B** 270, 313–322.

Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. e Hallwachs, W. (2004a). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 101, 14812–14817.

Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemlak, T.S. e Francis, C.M. (2004b). Identification of birds through DNA barcodes. **PloS Biology** 2, 1657–1663.

Hickerson, M.J.; Meyer, C.P. e Moritz, C. (2006). DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. **Systematic Biology** 55, 729–739.

Hillis, D.M.; Moritz, C. e Mable, B.K. (1996). **Molecular Systematics**. 2a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Hills, D.M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematic. **Ann Rev Ecol System** 18: 23-42.

Hilsdorf, A.W.S.; Azevedo-Espin, A.M.L.; Krieger, M.H. e Krieger, J.E. (2002). Mitocondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* from the Paraíba do Sul basin, Brazil. **Aquaculture**, 214(1):81-91.

Hogg, I.D. e Hebert, P.D.N. (2004). Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology** 82, 749–754.

Hold, G.L.; Smith, E.A.; Rappe, M. e 7 other authors (2001). Characterization of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. **FEMS Microbiol Ecol 37**, 161-173.

Howell, W.M. e Black, D.A. (1979). Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish *Fundulus diaphanus*. **Copeia**, 4: 544–546.

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.

Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.I.R. e Meyer, A. (2006). Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conserv.** 8: 297-308.

Ikeda, M. e Taniguchi. N. (2002). Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA Dloop region. **Fish Sci** 68:18–26.

Ivanova, N.V.; deWaard, J.R. e Hebert, P.D.N. (2006). An inexpensive, automationfriendly protocol for recovering high-quality DNA. **Molecular Ecology Notes** 6, 998–1002.

Johansen, C.; Sexena, N.P.; Chauhan, Y.S.; Subbarao, G.V.; Pundir, R.P.S.; Kumar, R.J.D.K. e Jana. M.K. (1990). Genotypic variation in salinity response of chickpea and pigeonpea. *In*: **Proceddings of the International Congress of Plant Physiology**. New Delhi. Abstracts: Society of plants physiology and Byochemistry, 973-978.

Jones, R.N. e Rees, H. (1982). B chromosomes. **Academic Press**, London, U.K.

Juan, C.; Pons, J. e Petitpierre, E. (1993). Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Res** 1:167-174.

Kimura, M. (1980). A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16, 111–120.

Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Lee, M.R. e Elder, F.F.B. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogen. Cell Genet**., 26: 36-40.

Lefebure, T.; Douady, C.J.; Gouy, M. e Gibiert, J. (2006). Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40, 435–447.

Levan, A.; Fredga, K. e Sandbreg, A.A. (1964). Nomeclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.

Li, W.H. (1993). Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. **J. Mol. Evol** 36:96-99.

Li, M.; Wei, F.; Goossens, B.; Feng, Z.; Tamate, H.B.; Bruford, M.W. e Funk, S.M. (2005). Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. **Mol Phylogenet Evol** 36: 78-89.

Liu, J.; Gao, T.; Zhuang, J.; Yokogawa, K. e Zhang, Y. (2006). Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). **Mol Phylogenet evol** 39: 799-811.

Lorenz, J.G.; Jackson, W.E.; Beck, J.C. e Hanner, R. (2005). The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society** B 360, 1869–1877.

Lozano, R.; Rejon, C.R. e Rejon, M.R. (1988). A method for increasing the number of mitoses avaliable for cytogenetic analysis in rainbow trout. **Stain Technology** 66(6): 335-338.

Mabuchi, K.; Miya, M.; Satoh, T.P.; Westneat, M.W. e Nishida, M. (2004). Gene rearrangements and evolution of tRNA pseudogenes in the mitochondrial genome of the parrotfish (Teleostei: Perciformes: Scaridae). **J Mol Evol** 59: 287-297.

Machordom, A. e Doadrio, I. (2001). Evidence of a cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (Luciobarbus, Cyprinidae). **Mol Phylogenet Evol** 18:252–263.

Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. e Almeida-Toledo, L.F. (1992). Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica** 87: 101–106.

Maistro, E.L.; Dias, A.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. e Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy in *Astyana scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurence of macro B chromosomes. **Caryologia**, 47 (3-4): 233-239.

Maistro, E.L.; Prieto-Mata, E.; Foresti, F. e Oliveira, C. (1998a). Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica** 104:1-7.

Maistro, E.L.; Oliveira; C. e Foresti, F. (2001). Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica** 110: 177–183.

Maistro, E.L.; Jesus, C.M.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. e Foresti, F. (2004). Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). **Cytologia** 69:181-186.

Mandrioli, M.; Manicardi, G.C.; Machella, N. e Caputo, V. (2001). Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). **Genetica**, 110:73-78.

Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, 109:161-168.

Margarido, V.P. e Galetti, P.M. Jr. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** 22(3), 357-361.

Martin, A.P. e Palumbi, S.R. (1993). Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and mammals. **Mol. Biol. Evol**. 10: 873-891.

Martins, C. e Galetti Jr, P.M. (1997). Narrow chromosome diversity in fish of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, 92:139-147.

Martins, C. e Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinu*s fish (Anastomidae, Characiformes). **Chrom Res** 7: 363-367.

Martins, C., Galetti Jr., P.M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chrom Res** 8: 353-355.

Martins, C. e Galetti Jr, P.M. (2001). Two 5S rDNA arrays in neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica,** 111:439-446.

Matioloi, S.R. (Ed.). (2001). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos.

McElroy, D.; Moran, P.; Bermingham, E. e Kornfield, I. (1992). The Restriction Enzyme Analysis Package (REAP). Version 4.0. **J Hered** 83:157-158.

Meier, R.; Shiyang, K.; Vaidya, G. e Ng, P.K.L. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. **Systematic Biology** 55, 715–728.

Melo, M.R.S. (2001). Sistemática, Filogenia e Biogeograia do Grupo *Characidium lauroi* Travassos, 1949 (Characiformes, Crenuchidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 95p.

Melo, M.R. e Buckup, P.A. (2002). *Characidium stigmosum* (Characiformes: Crenuchidae): a new species of characidiin fish from central Brazil. **Copeia**. 4: 988– 993.

Meyer, A. (1994). Genetics and evolution of aquatic organisms. Beaumont

Miller, O.J.; Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravahi, R. e Croce, C.M. (1976). Expression of human ans suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. **Proc. Natl. Acad. Sci**, USA 73:4531-4535.

Mitchell, A. (2008). DNA barcoding demystified. **Australian Journal of Entomology** 47, 169–173.

Miya, M.; Takeshima, H.; Endo, H.; Ishiguro, N.B.; Inoue, J.G.; Mukai, T.; Satoh, T.P.; Yamaguchi, M.; Kawaguchi, A.; Mabuchi, K.; Shirai, S.M. e Nishida, M. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial SNA sequences. **Mol Phylog Evol** 26: 121-138.

Miyazawa, C.S. e Galetti-Jr, P.M. (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Cytologia**. 59:73-79.

Mohindra, V.; Singh, R.K.; Palanichamy, M.; Ponniah, A.G.; Lal, K.K. (2007). Genetic Identification of three species of the genus *Clarias* using allozyme and mitochondrial DNA markers. **J. Appl. Ichthyol**. 23: 104-109.

Molina, W.F. e Galetti Jr, P.M. (2001). Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. **Genetics and Molecular Biology,** 25(4):373-377.

Molina, W.F.; Shibatta, O.A. e Galetti Jr, P.M. (2008). Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, 31:270-274.

Montoya-Burgos, J.I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna**. Mol. Ecol**., Oxford, 2:1855-1867.

Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. e Galetti, P.M. (1993). Distribuition of sex chromosome machanisms in fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, 46 (2-3): 115-125.

Moritz, C.; Dowling, T.E. e Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Ann Rev Ecol Syst.**18: 269-292.

Moritz, C. e Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. **Public Library of Science Biology**, 2:1529–1531.

Moyer, G.R.; Burr, B.M. e Krajewski, C. (2004). Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecularand morphological data. **Zool J Linnean Society** 140: 551-575.

Moysés, C.B.; Almeida-Toledo, L.F. (2002). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fishes species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genet. Mol. Biol.** 25: 401-407.

Nei, M. e Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restrictionendonucleases. **Genetics**, 125:873-879.

Neigel, J.; Domingo, A. e Stake, J. (2007). DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. **Coral Reefs** 26:487–499.

Nelson, J.S. (2006). **Fishes of the world**. 4 ed., Jonh Wiley e Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

Noleto, R.B.; Amorin, A.P.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. e Cestari, M.M. (2009). An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. **Journal of Fish Biology**, 75: 448-453.

Ohnaka, T.; Sasaki, H.; Nagai, K. e Numachi, K. (1999). Marked monomorphism at the D-loop region of mtDNA in an endangered species *Pseudorasbora pumila* subsp. *sensu* Nakamura (1963) (in Japanese with English abstract). **Nippon Suisan Gakkaishi** 65:1005–1009.

Oliveira, C. e Foresti, F. (1993). Occurence of a supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios** 76: 183-186.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. e Foresti, F. (1996). Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. **VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**, São Carlos, SP, p. 104.

Ornelas-García, C.P.; Domínguez-Domínguez, O. e Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Bair & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. BMC **Evol Biol** 8:340.

Ortí, G.; Petry, P.; Porto, J.I.R.; Ju. M. e Meyer, A. (1996). Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **J Mol Evol** 42: 169-182.

Osatomi, K.; Nozoe, T.; Tsunemoto, K.; Hara, K.; Ichinoki, T.; Takita, T. e Ishihara, T. (2001). PCR-RFLP analysis of two flathead species of the genus *Platycephalas* from the Ariake Sound, Japan (in Japanese with English abstract). **Nippon Suisan Gakkaishi** [Fish Sci (Tokyo)] 67:503–504.

Oshida, T.; Shindo, J. e Yoshida, M.C. (1999). Nor-bearing Y chromosome in American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia, Castoridae). **Chromosome Science**, 3:117-118.

Parise-Maltempi, P.P. e Avancini, R.M.P. (2001). C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies Chrysomya megacephala and Chrysomya putoria (Diptera, Calliphoridae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 96: 371-377.

Passarge, E. (1995). **Color atlas of genetics**. Thieme Medical Publishers. New York.

Pauls, E. e Bertollo, L.A.C. (1983). Evidence for a system of supranumerary chromosomes in Prochilodus scrofa Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, 36(4): 307-314.

Pelegrino, K.C.; Rodrigues, M.T. e Yonenaga-Yassuda, Y. (2001). A molecular perspective on the evolution of microteiid lizars (Squamata, Gymnophthalmidae) and a new classification to the family. **Biol J Linnean Soc** 74: 315-338.

Pellegrini, M.; Manning, J. e Davidson, N. (1977). Sequence arrangement of the rRNA of *Drosophyla melonogaster*. **Cell**. 10:213-224.

Perdices, A.; Bermingham, E.; Montilla, A. e Doadrio, I. (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. **Mol Phylogenet Evol** 25:172-189.

Pinkel, D.; Straume, T. e Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sc**. 83*:* 2934-2938.

Pleijel, F.; Jondelius, U.; Norlinder, E.; Nygren, A.; Oxelman, B.; Schander, C.; Sundberg, P. e Thollesson, M. (2008). Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 48, 369–371.

Posada, D. e Crandall, K.A. (1998). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14: 917-818.

Pretti, V.Q.; Calcagnotto, D.; Toledo-Piza, M. e Almeida-Toledo, L.F. (2009). Phylogeny of the Neotropical genus *Acestrorhynchus* (Ostariophysi: Characiformes) based on nuclear and mitochondrial gene sequences and morphology: A total evidence approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 52: 312-320.

Prioli, S.M.A.; Prioli, A.J.; Julio Jr., H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V.; Carrer, H.; Carraro, D.M. e Prioli, R.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based n mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genet Mol Biol** 25(4): 421-430.

Queiroz, A.; Donoghue, M.J. e Kim, J. (1995). Separeted versus combined analysis of phylogenetic evidence. **Ann Rev Ecol System** 26: 657-681.

Reis, R.E.; Kullarnder, S.O. e Ferraris JR., C.J. (2003). **Checklist of the freshwater fishes of South América and Central América**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Roe, A.D. e Sperling, F.A.H. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 44, 325–345.

Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O. e Vieira, M.F. (2005). Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Rev Bras Bot** 28:285-294.

Rubinoff, D.; Cameron, S. e Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for ‘‘barcoding’’ identification. **Journal of Heredity** 97, 581–594.

Ruedas, L.A.; Salazar-Bravo, J.; Dragoo, J.W. e Yates, T.L. (2000). The importance of being earnest: what, if anything, constitutes a “Specimen Examined?” **Molecular Phylogenetics and Evolution** 17, 129–132.

Russo, J.J.; Bohenzky, R.A.; Chien, M.C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D.; Parry, J.P.; Peruzzi, D.; Edelman, I.S.; Chang, Y. e Moore, P.S. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). **Proceedings of the National Academy of Sciences,** USA 93, 14862-14867.

Saitou, N., e Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol** 4: 406-425.

Sanetra, M. e Crozier, R.H. (2003). Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomymecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Mol Ecol** 12: 2281-2295.

São Thiago, H. (1990). Composição e distribuição longitudinal da ictiofauna do rio Parati-Mirim (RJ) e aspectos sobre a reprodução das principais espécies. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 165p.

Saunders, G. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. **Philosophical Transactions of the Royal Society** B 360, 1879–1888.

Savolainen, V.; Cowan, R.S.; Vogler, A.P.; Roderick, G.K. e Lan, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society** B 360, 1805–1811.

Schmid, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and AT rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103.

Schmid, M. e Guttembach, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Cromosoma**, 97*:* 101-114.

Seifert, K.A.; Samson, R.A.; deWaard, J.R.; Houbraken, J.; Levesque, C.A.; Moncalvo, J.M.; Louis-Seize, G. e Hebert, P.D.N. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with Penicillium as a test case. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 104, 3901–3906.

Shearer, T.L.; Van Oppen, M.J.H.; Romano, S.L. e Worheide, G. (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). **Molecular Ecology** 11, 2475–2487.

Shimabukuro-Dias, C.K.; Oliveira, C. e Foresti, F. (2004). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Corydoradinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). **Genet. Molecular Biol**. 27(4):549-554.

Silva, A.R. e Maistro, E.L. (2006). Cytogenetic divergence between two sympatric species of Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado River, Minas Gerais, Brazil. **Genet. Mol. Biol**. 29(3): 459-463.

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

Smith, M.A.; Woodely, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. e Hebert, P.D.N. (2006). DNA barcoding reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a

genus of parasitoid flies (Diptera, Tachinidae). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 103, 3657–3662.

Sorenson, M.D. (1999) **TreeRot, version 2**. Boston University, Boston MA.

Souza, I.L.; Galián, J.; Rua, P.; Bertollo, L.A.C. e Moreira-Filho, O. (2001). Nonrandom distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. **Cytologia**, 66:85-91.

Strauss, E. (1999). Can mitochondrial clocks keep time? **Science**, 283, 1435-1438.

Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Expl. Cell Res**. 75: 304-306.

Sumner, A.T. (2003). **Chromosome organizer and function.** London: Unwin Hyman.

Swofford, D.L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA.

Szymura, J.M.; Spolsky, C. e Uzzell, T. (1986). Concordant change in mitochondrial and nuclear genes in a hybrid zone between *two* frog species (genus *Bombina*). **Experientia** 41: 1469-1470.

Tamura, K. e Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transvertion and g + c- contente biases. **Mol Biol Evol** 9: 678-687.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G. e Gibons, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weithing, position-specifi gap penalties and weithg matrix choice. **Nucleic Acids Res** 22: 4673-4680.

Toffoli, D.; Hrbek, T.; de Araujo, M.L.G.; de Almeida, M.P.; Charvet-Almeida, P. e Farias, I.P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). **Genet. Mol. Biol**. 31, 324–336.

Travassos, H.A. (1949a). Notas Ictiológicas I. "*Characidium lauroi*" n. sp. (Actinopterigii, Ostareophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, 9(1):87-92.

Travassos, H.A. (1955). Sobre um novo peixe do estado do Paraná (Actinopterigii, Cypriniformes, Characoidei). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 27:365-371.

Travassos, H.A. (1956). Ictiofauna de Pirassununga. II – Sobre Characidiinae H. Travassos, 1952 (Cypriniformes, Characoidei). **Boletim do Museu Nacional Zoológica, Nova Série**, 135:1-14.

Travassos, H.A. (1967). Três novas espécies o gênero *Characidium* Reinhardt, 1866 (Actinopterigii, Characoidei). **Papeis avulsos de Zoologia**, São Paulo, 20(4):45-53.

Triantafyllidis, A.; Abatzopoulos, T.J.; Economidis, P.S. (1999). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. **Heredity**. 82: 503-509.

Valdez-Moreno, M.; Ivanova, N.V.; Elías-Gutiérrez, M.; Contreras-Balderas, S. e Hebert, P.D.N. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology**, **74**, 377–402.

Venere, P.C. e Galetti Jr., P.M. (1985). Natural triploidy and chromosome B infish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Ver. Brás. Genet**., VIII (4): 681-687.

Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C. (2008). Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**. 134: 311-317.

Vicente, V.E.; Moreira-Filho, O. e Camacho, J.P.M. (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in Astyanax *scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 74:70-75.

Volobujev, V.T. (1980). The B-chromosome system of mammals. **Genetica**, 52/53: 333-337.

Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. e Hebert, P.D.N. (2005). Barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society** B 360, 1847–1857.

Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays** 29, 188–197.

Ward, R.D. e Holmes, B.H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. **Molecular Ecology Notes** 7, 899–907.

Ward, R.D.; Hanner, R. e Hebert, P.D.N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology** 74, 329–356.

Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86, 6196–6200.

Wolfe, A.D. e Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *In:* Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. Eds. **Molecular Systematics of plants**. II. DNA sequencing. Norqell: Kluwer Academic Publishers, 43-86.

Xia, X. e Xei, Z. (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J Heredity** 92: 371-373.

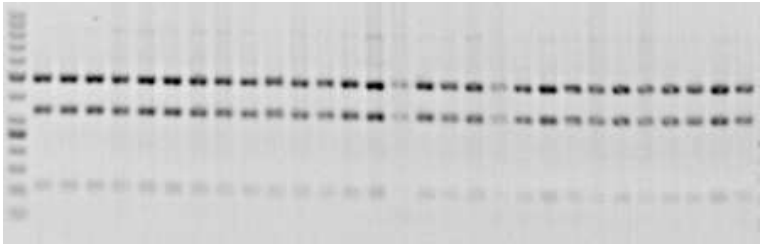
Yonenaga-Yassuda, Y.; Assis, M.F.L.; Kasahara, S.; L'Abbate, M. e Souza, M.J. (1983). Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the acticity of rDNA genes on both X chromosomes of females. **Cytogenet. Cell Genet.** 35:143-147.

Yoo, H.S.; Eah, J.Y.; Kim, J.S.; Kim, Y.J.; Min, M.S.; Paek, W.K.; Lee, H. e Kim, C.B. (2006). DNA barcoding Korean birds. **Molecules and Cells** 22, 323–327.

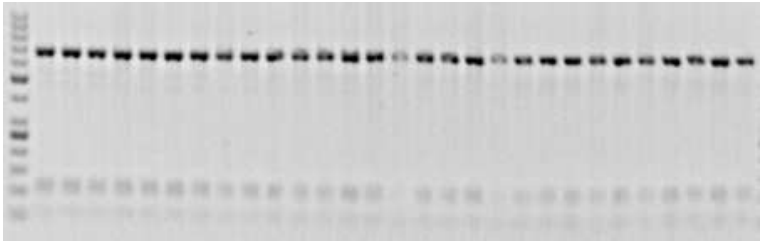
Anexo 1

Padrão de restrição para *Characidium* sp.2, com *ladder* de 50 pb.

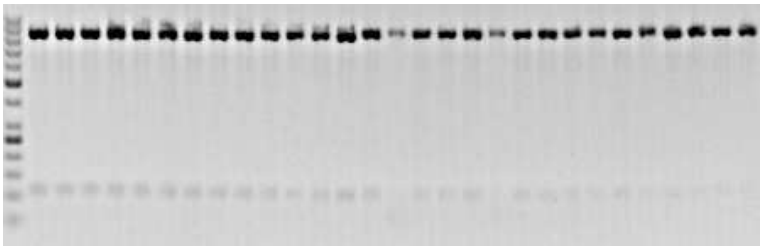
Alu I



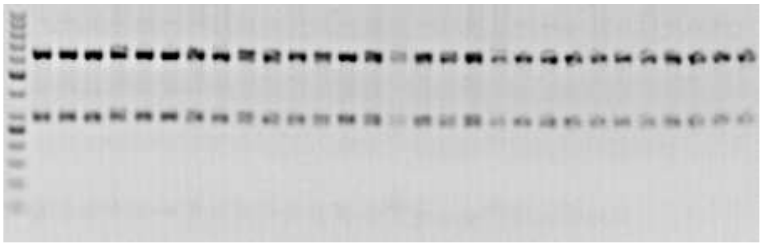
Hae III



Hind III

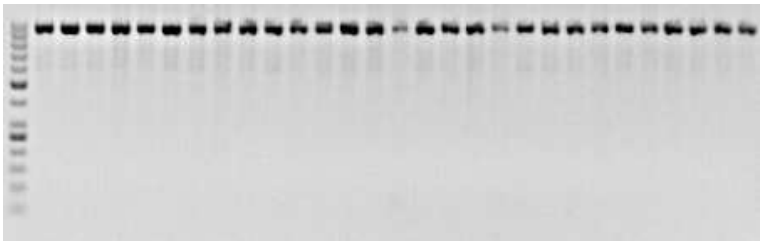


Hinf I

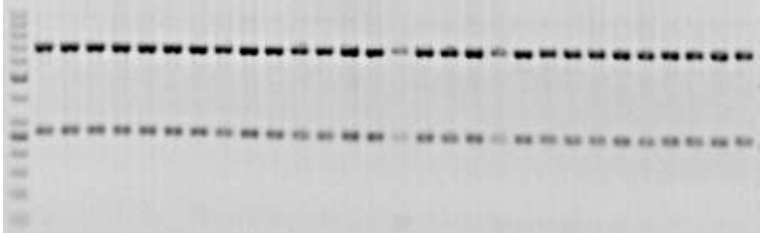


Hpa II

Mbo I

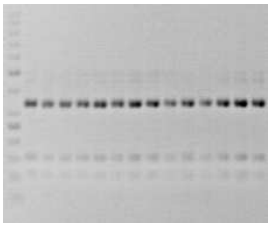


Rsa I



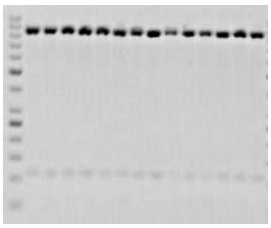
Padrão de restrição para *Characidium japuhybense*, com *ladder* de 50 pb.

Alu I

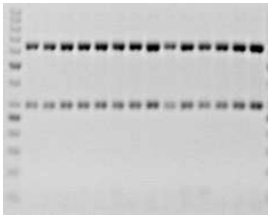


Hae III

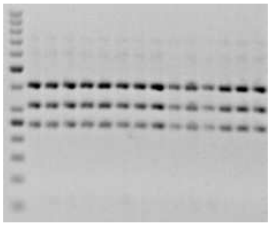
Hind III



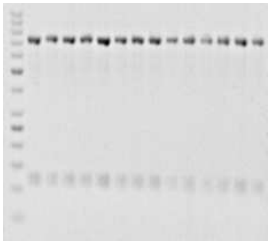
Hinf I



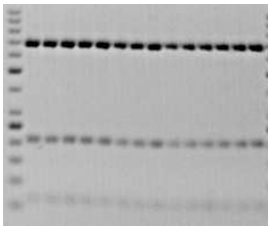
Hpa II



Mbo I

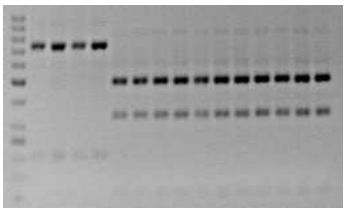


Rsa I

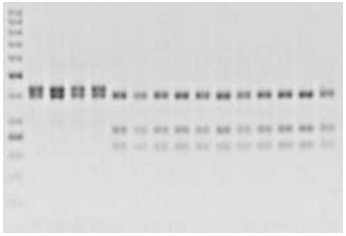


Padrão de restrição para *Characidium* sp.1 (4 primeiros poços) e *Characidium lauroi*, com *ladder* de 50 pb.

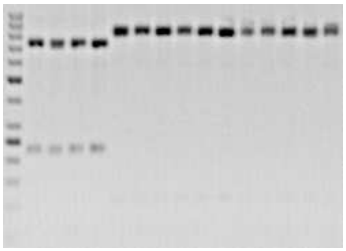
Alu I



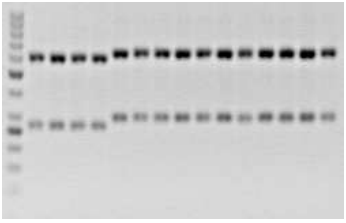
Hae III



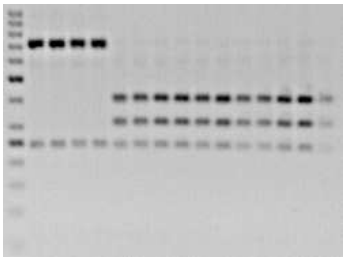
Hind III



Hinf I

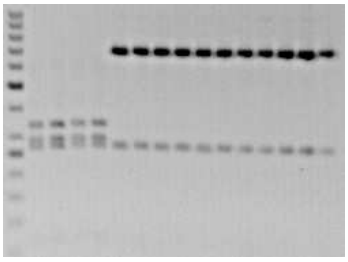


Hpa II



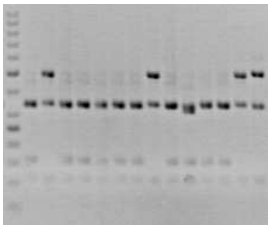
Mbo I

Rsa I

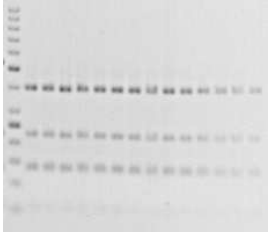


Padrão de restrição para *Characidium oiticicai*, com *ladder* de 50 pb.

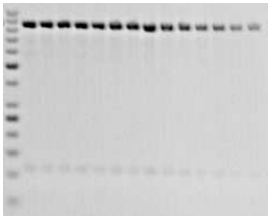
Alu I



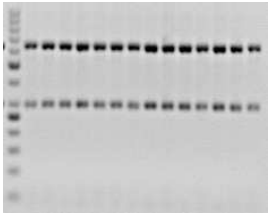
Hae III



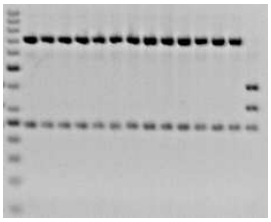
Hind III



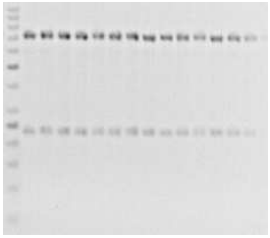
Hinf I



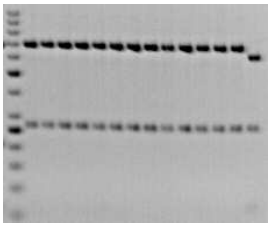
Hpa II



Mbo I

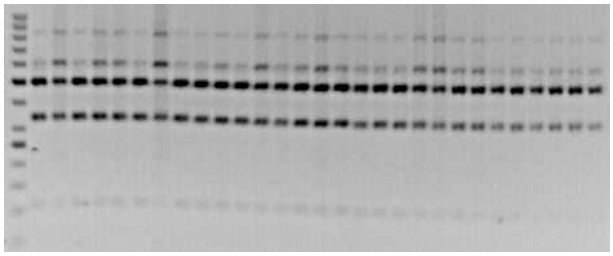


Rsa I

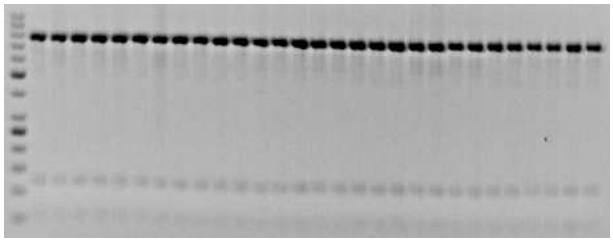


Padrão de restrição para *Characidium schubarti*, com *ladder* de 50 pb.

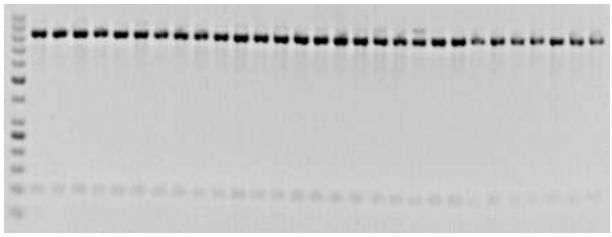
Alu I



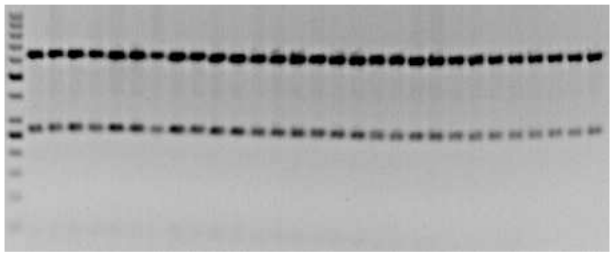
Hae III



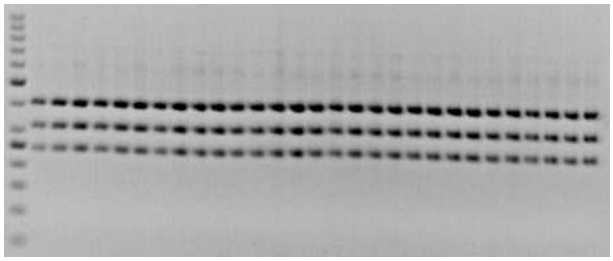
Hind III



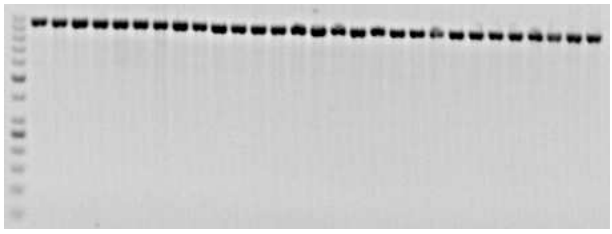
Hinf I



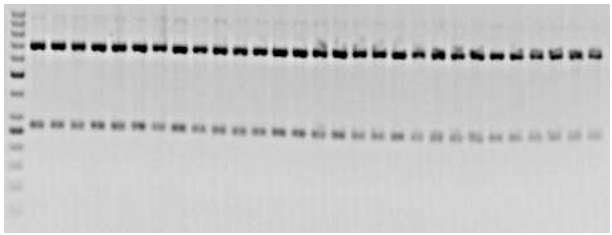
Hpa II



Mbo I

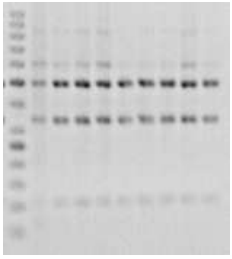


Rsa I

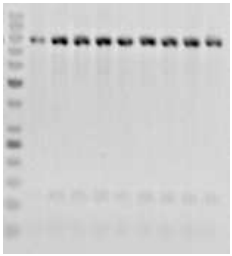


Padrão de restrição para *Characidium schubarti* (p2) , com *ladder* de 50 pb.

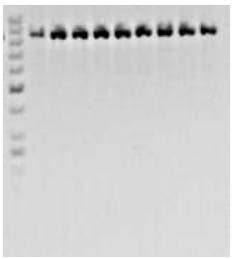
Alu I



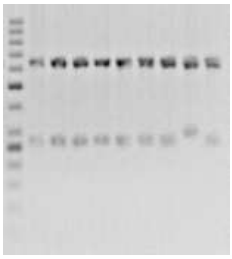
Hae III



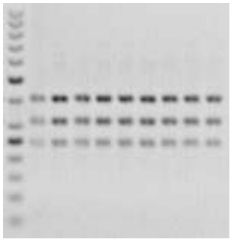
Hind III



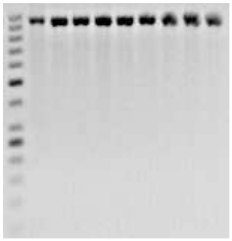
Hinf I



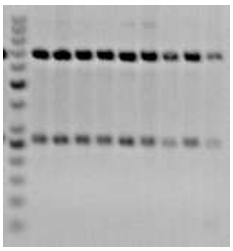
Hpa II



Mbo I

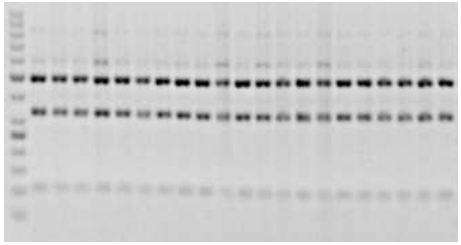


Rsa I

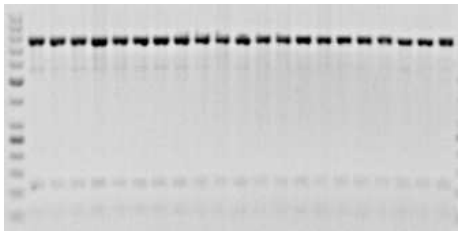


Padrão de restrição para *Characidium schubarti* (sma) , com *ladder* de 50 pb.

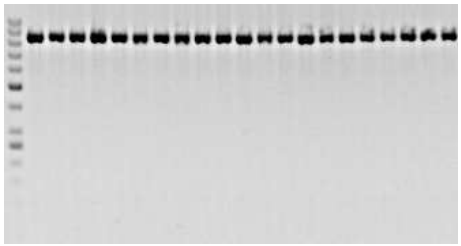
Alu I



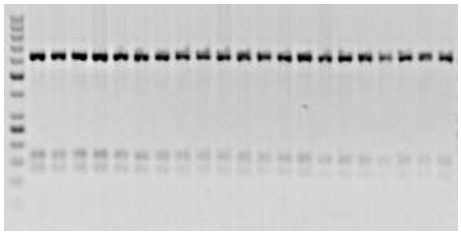
Hae III



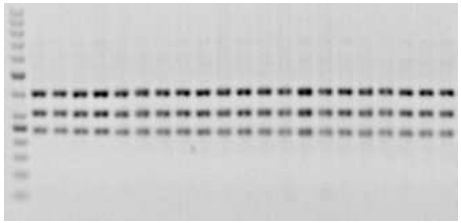
Hind III



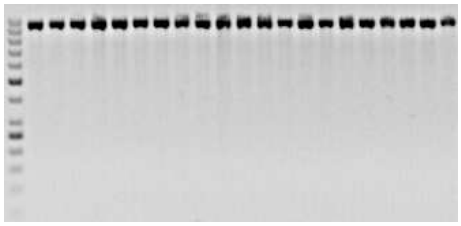
Hinf I



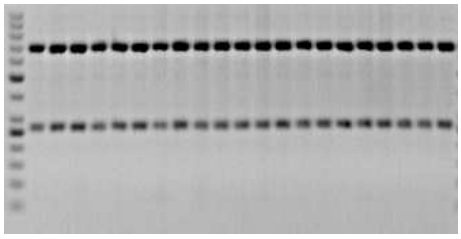
Hpa II



Mbo I

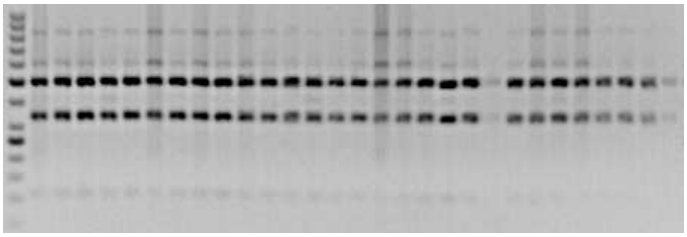


Rsa I

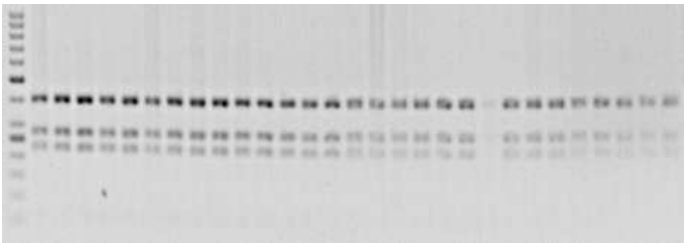


Padrão de restrição para *Characidium* sp. “piabanha” , com *ladder* de 50 pb.

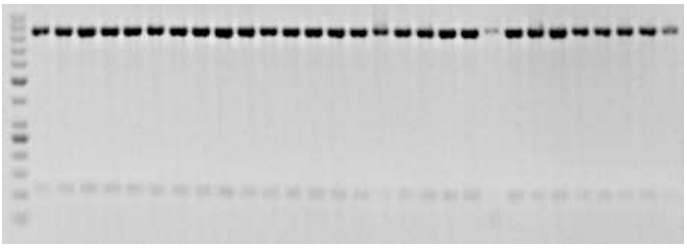
Alu I



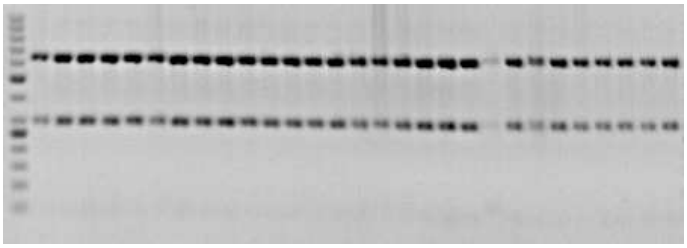
Hae III



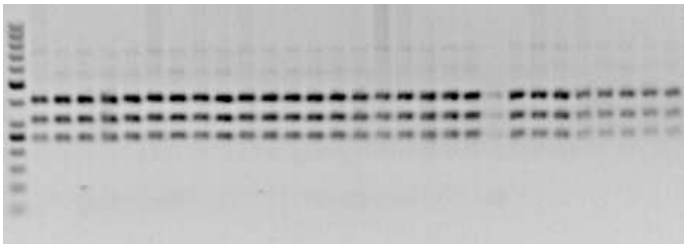
Hind III



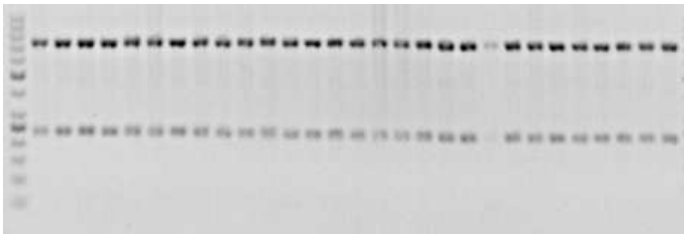
Hinf I



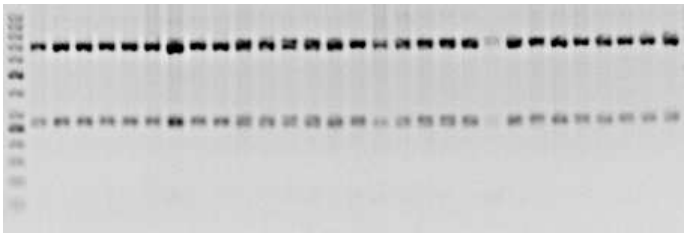
Hpa II



Mbo I

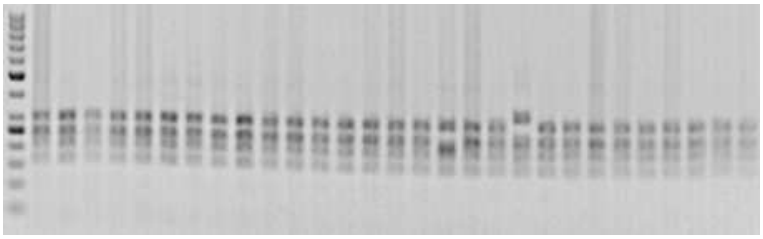


Rsa I

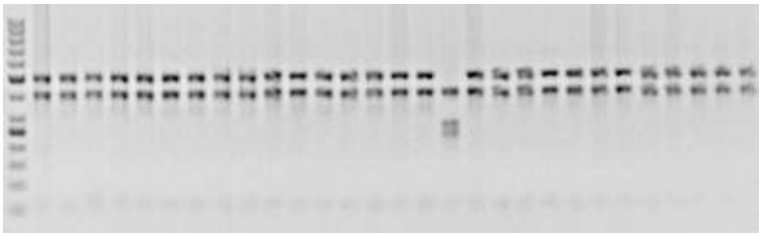


Padrão de restrição para *Characidium* cf. *zebra*, com *ladder* de 50 pb.

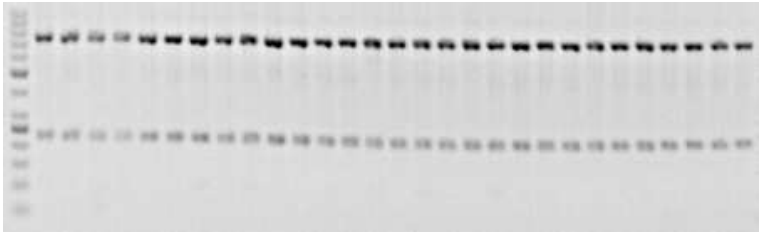
Alu I



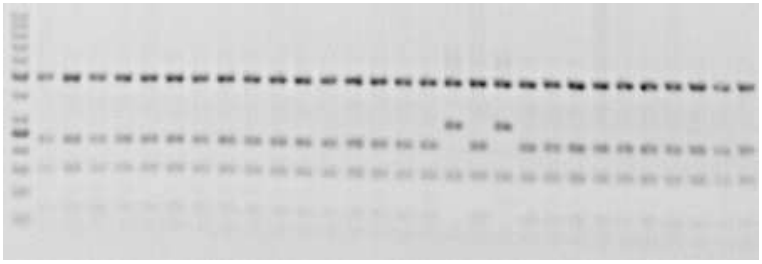
Hae III



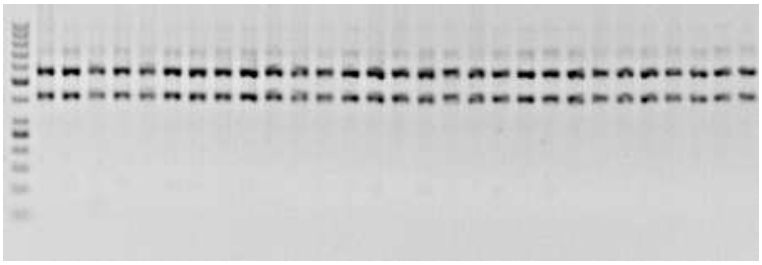
Hind III



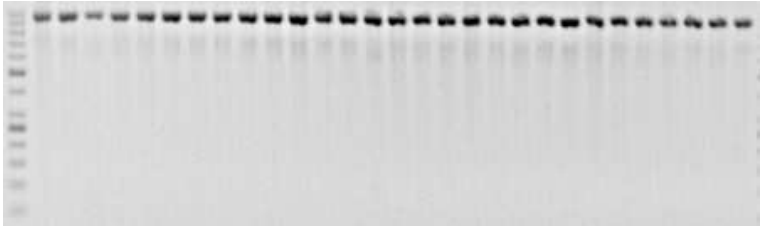
Hinf I



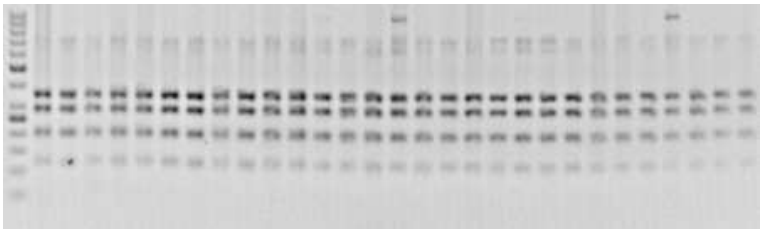
Hpa II



Mbo I



Rsa I



Anexo 2

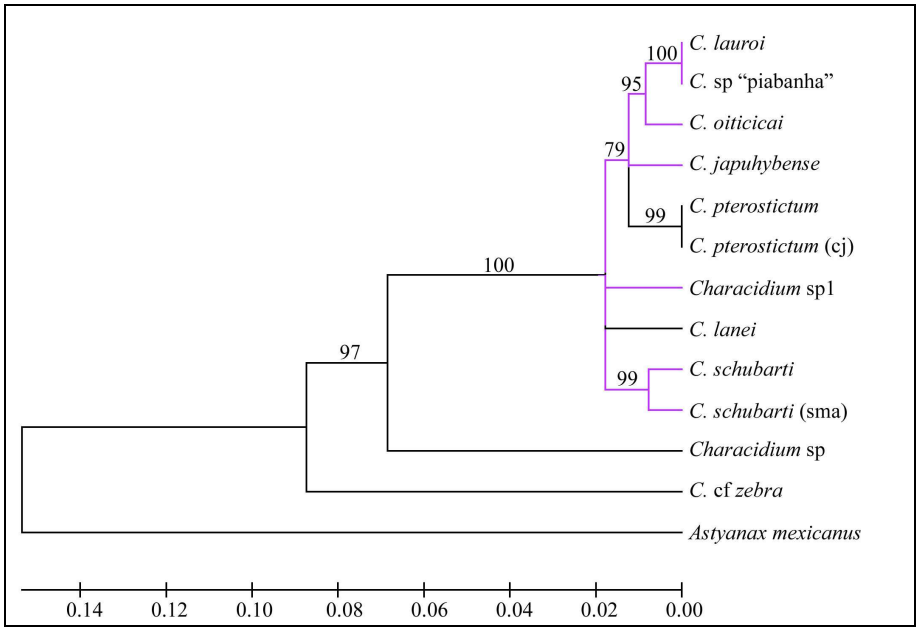


Figura 22: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.

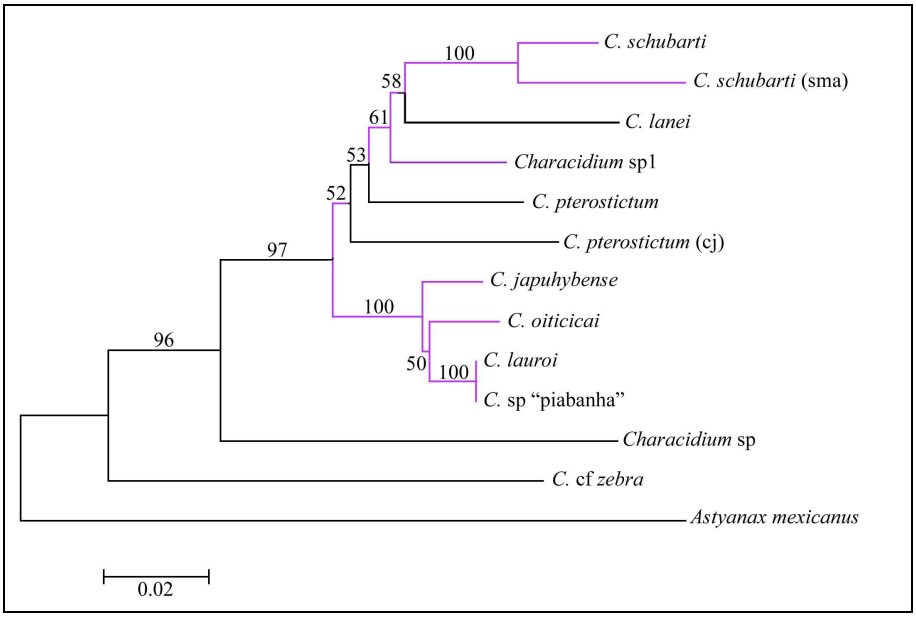


Figura 23: Reconstrução filogenética a partir do método de Neighbor Joining, com método de distância de Tamura-Nei, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.

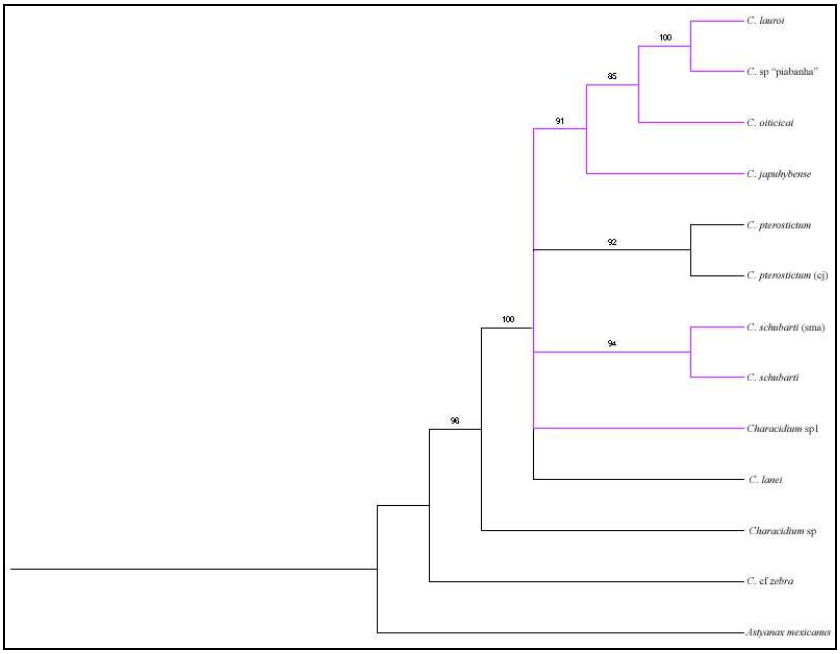


Figura 24: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene ATPase 6 e 8 de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.

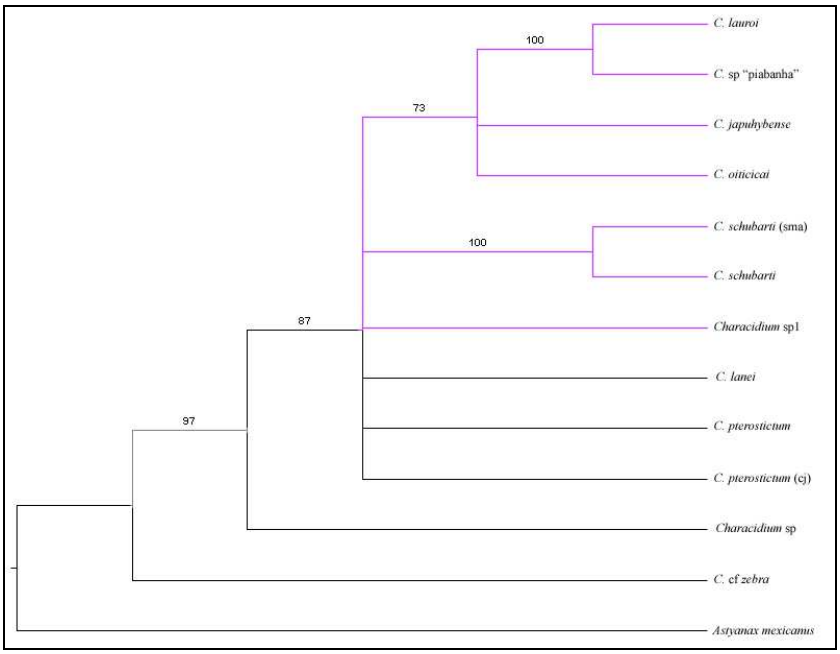


Figura 25: Reconstrução filogenética a partir do método Máxima Parcimônia, com base na sequência do gene Citocromo b de todas as espécies estudadas o presente trabalho, incluindo as do grupo *Characidium lauroi* (ramos em destaque). Os valores correspondem ao *bootstrap* para 1000 réplicas.