

Caroline Garcia

Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia*
(Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de
relações evolutivas.



São Paulo

2009

Caroline Garcia

Estudos cromossômicos e moleculares em
Rhamdia (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae):
análise de relações evolutivas.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia-Genética.

Orientadora: Prof^a Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

Garcia, Caroline

Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas.

147pp.

Tese (Doutorado)

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

1. Citogenética 2. Cromossomos supranumerários 3. DNA mitocondrial 4. Filogenia 5. *Rhamdia*

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Prof^ª Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo


"Era ainda jovem demais para saber que a memória do coração elimina as más lembranças e enaltece as boas e que graças a esse artifício conseguimos suportar o passado."

Gabriel Garcia Márquez - O amor nos tempos do cólera

Dedico esta tese:

Àqueles que foram e são minha base e meu apoio, minha pequena família torta:

Oswaldo

Irene (em nosso )

Verônica

Àqueles que me deram oportunidade e muito me ensinaram:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof^a Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Àqueles que moram no meu coração e sem as quais a vida não teria graça, os momentos difíceis não seriam superados e os mil cariótipos e hibridações não seriam feitos:

Karina de Oliveira Brandão – Papis'2

Karine Frehner Kavalco – Ká, Praga Amada

Keila Chiaratti de Oliveira – Keilinha *Characidium* Extinto

Márcia Maria Laguna – Marcinha Lagartinho Minúsculo

Patrícia da Rocha Garcia – Titinha Banana Ralada

Regina Capalbo – Pudim Panda

Verônica Garcia – Dadá

Maggy-Maggy

Agradecimentos

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

Em primeiro lugar agradeço à Prof^a Lurdes, pela oportunidade de fazer parte da equipe de seu laboratório, por todo o apoio na realização do meu trabalho e por toda confiança que deposita em mim. Agradeço por todas as conversas e conselhos, broncas e ensinamentos, que muito contribuíram para meu crescimento. Agradeço a Sra. por ser mais do que apenas uma orientadora, mas alguém que se preocupa com o bem-estar e a felicidade das pessoas com que trabalha.

À CAPES pelo auxílio financeiro recebido.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências pela infraestrutura e oportunidade de realização do meu trabalho de doutoramento.

Ao Prof Dr. Orlando Moreira Filho, meu primeiro orientador e pai-científico, que me apresentou a Genética de Peixes e me ensinou a respeitar, não apenas meu material de trabalho, mas meus companheiros de pesquisa.

Ao Prof. Claudio de Oliveira, meu Co-orientador, uma pessoa maravilhosa e sempre disponível, que teve, e tem, uma paciência imensa para me ensinar novas ferramentas de trabalho e para discutir meus dados, sempre contribuindo com ótimas idéias.

À Prof^a Eleonora Trajano por sua contribuição com muitos dos exemplares utilizados no presente estudo e por seu jeito apaixonante de ver os peixes, que trouxe mais amor ao meu trabalho.

Ao Prof. Carlos Ribeiro Vilela, por todo o apoio e amizade...por ter me aturado na monitoria e por ter me “emprestado” as mesas do laboratório durante a impressão das figuras.

À Deisy e a Helenice, duas pessoas maravilhosas e que me acompanham desde antes de eu entrar no doutorado. À vocês meu muito obrigado por toda a ajuda prestada, por sempre estarem disponíveis, pelas conversas divertidas e pelo carinho dispensado.

Aos meus queridos Eduardo, Leandro e Mário, que sempre fizeram de tudo para me ajudar a conseguir verbas da Proap. Muito obrigada por toda a ajuda e os momentos divertidos que passamos juntos.

Aos colegas que fazem ou já fizeram parte do laboratório de Ictiogenética e com os quais compartilhei boas risadas, situações engraçadas e ensinamentos: Bianca, Daniella, Felipe, Fred, Marilena, Raquel, Riviane, Sabrina e Vânia.

Ao Carlos Eduardo Lopes pela inestimável ajuda durante coletas, por me deixar comer KinderOvo, pelas muitas risadas e por não espalhar sobre meus tombos básicos durante o trabalho de campo.

Aos apêndices laboratoriais e meu cunhado, mais do que apenas pessoas muito queridas, meus grandes amigos, com os quais compartilhei problemas e alegrias e que muito me ensinaram: Marcus Frabricius (cunhadinho) Alisson e Ellen, Arturrrrrrrr (meu grande amigo baiano), Claudinha, Pedro Hollanda, Lala, Thiago, Mateus, Ary, Priscila, Mirela e Luiza.

Aos meus amigos distantes, e não menos queridos, que muito torcem por mim: Carol Dal Ri, Thati Crevelari, Rubens e Gabizinha (Xuxu), Romulo (Ramón), Eduardo Galeazzi, Débora Diniz, Vitor Lunardi, Daniel, Marcelo Vicari e Wellington.

Às minhas grandes *pseudo-amigas*, que eu carrego sempre no coração, pessoas maravilhosas que entraram na minha vida das mais variadas formas e que conquistaram um lugar especial, como eu prometi, cada uma vai ter um parágrafo de agradecimento, mas desde já saibam que nem uma tese inteira seria suficiente para dizer o quanto vocês são importantes para mim:

Ká, somos amigas a mais de seis anos. Nossa amizade passou por altos e baixos, mas sobreviveu e agora está mais forte do que nunca. Obrigada por tudo, não só por tudo que fez pelo meu lado profissional, me ensinando, corrigindo minha tese, me direcionando....mas por me ensinar a ser alguém melhor, por me aceitar como eu sou e por perdoar meus erros.

Pupis'2, obrigada por ser minha grande amiga, por ter um carinho imenso por mim e por estar ao meu lado sempre, mesmo que distante. Obrigada por toda a ajuda na realização de técnicas e

coletas. Obrigada por ser minha filha, amiga e irmã, por todos os conselhos e todo o apoio, depois de você a vida nunca mais foi a mesma (nem minhas reservas de bolachas e pirulitos).

Keilinha, hihhi...obrigada por ser minha parceira de laboratório, o trabalho ao seu lado é muito mais divertido (menos quando eu tenho que te ajudar com aqueles peixes minúsculos que vc decidiu trabalhar). Obrigada por ser uma grande amiga, por me incluir na sua vida (e viva a madrinhaaaaa com quartinho no novo QG) e por fazer parte da minha. Obrigada por estar sempre disponível para me ouvir, consolar ou me chamar para a realidade. Beijo Tchou.

Marcinha, você não é parte oficial do laboratório, mas assim como a Keila, é minha parceira de trabalho, afinal, estamos sempre trocando informações e técnicas...só deixo claro que nós te damos peixinhos e você não nos dá sapinhos!!!!!! Marcinha, você é uma das minhas grandes amigas também, com seu jeitinho meigo e engraçado me cativou...e agora vai ter que me aguentar, pois você se torna responsável por aquilo que cativa. Obrigada por sempre cuidar de mim, por estar ao meu lado nos momentos felizes e nos não tão felizes assim. Beijo Tchou.

Regina e Titinha, obrigada por todas as conversas, baladas, risadas, conselhos e chamadas. Obrigada pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas, pelas sessões de filmes e pelos "micos" compartilhados.

À minha pequena família: Oswaldo e Verônica...obrigada por tudo, sem vocês a vida simplesmente não tem porquê. Amo muito vocês.

Aos meus familiares por todo o apoio: Arnaldo, Sandra, Dani, Jú, Álvaro, Lurdes, André, Júnior, Renata, Mã, Thais e Nonô.

À minha filhinha Maggy, por ser tão especial e companheira, um amor sem medidas.



Sumário

Sumário

Lista de Figuras e Tabelas.....	i
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Introdução Geral	01
1.1 A Ordem Siluriformes e a família Heptapteridae.....	01
1.2 O gênero <i>Rhamdia</i> (Bleeker, 1858).....	09
1.2.1 Aspectos taxonômicos.....	09
1.2.2 Estudos citogenéticos.....	12
1.2.3 Estudos moleculares.....	17
1.3 Aplicação do sequenciamento de genes mitocondriais nos estudos das relações evolutivas em peixes, com ênfase em Siluriformes.....	20
1.4 Objetivos.....	23
Materiais e Métodos	25
2.1 Locais de coleta e material utilizado.....	25
2.2 Procedimentos metodológicos.....	29
2.2.1 Estudos citogenéticos.....	29
2.2.1.1 Preparação de cromossomos mitóticos (Gold <i>et al.</i> , 1990).....	29
2.2.1.2 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs)(Howell e Black, 1980).....	30
2.2.1.3 Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).....	30
2.2.1.4 Coloração por cromomicina A ₃ (Schmid, 1980).....	31
2.2.1.5 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	31
2.2.1.6 Captura de Imagens.....	35
2.2.2 Estudos Moleculares.....	35

2.2.2.1 Extração salina de DNA total (Aljanabi e Martinez, 1997).....	35
2.2.2.2 Amplificação dos genes mitocondriais.....	36
2.2.2.3 Purificação do produto de PCR e Sequenciamento.....	38
2.2.2.4 Obtenção e análise das sequências.....	39
2.2.2.5 Análises filogenéticas.....	40
Capítulo 1 - Análise citogenética comparativa entre populações de <i>Rhamdia</i> (Siluriformes, Heptapteridae) coletadas em cavernas brasileiras.....	43
Capítulo 2 - Tendências de evolução cariotípica em <i>Rhamdia quelen</i> (Siluriformes, Heptapteridae) e observações sobre a possível origem e diferenciação de seus cromossomos supranumerários.....	58
Capítulo 3 - Determinação de relações evolutivas e ocorrência de complexos de espécie em <i>Rhamdia</i> (Siluriformes, Heptapteridae) com base no sequenciamento de genes mitocondriais.....	87
Conclusões Gerais	115
Referências Bibliográficas	119
Anexo 1	136
Anexo 2	138

Lista de Figuras

- Figura 1.1 -** Hipótese das relações internas da família Heptapteridae (estrela), representada pelo cladograma de consenso estrito obtido por Bockmann (1998) com base em dados morfológicos..... 08
- Figura 1.2 -** Esquema ilustrativo da organização do genoma mitocondrial em vertebrados Fonte: Passarge (1995)..... 21
- Figura 2.1 -** Cariótipos de **A:** *R. enfurnada* e **B:** *R. quelen* – Água Escondida, corados com Giemsa. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S..... 55
- Figura 2.2 -** Cariótipos de *R. quelen* – Lapa do Peixe, corados com Giemsa. Em **A:** cariótipo padrão e em **B:** cariótipo variante (mosaico cromossômico). Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S..... 56
- Figura 2.3 -** Metáfases somáticas de *R. enfurnada* (**A, B**), *R. quelen* – Água Escondida (**C, D**) e *R. quelen* – Lapa do Peixe (**E, F**) após bandamento C (**A, C, E**) e FISH com sonda de DNAr 5S (**B, D, F**). As setas indicam os sítios de DNAr..... 57
- Figura 3.1 -** Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Santo Antônio do Pinhal e **B:** Córrego Sangão - Cascavel. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S..... 77
- Figura 3.2 -** Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Ipeuna e **B:** Botucatu. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S..... 78
- Figura 3.3 -** Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes 79

	de A: rio do Oeste - Cascavel e B: Iguape. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA ₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.....	
Figura 3.4 -	Cariótipos corados com Giemsa das populações de <i>R. quelen</i> provenientes de A: Guapiara e B: Colina. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA ₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.....	80
Figura 3.5 -	Cariótipos corados com Giemsa das populações de <i>R. quelen</i> provenientes de A: rio São José e B: rio Paraíba do Sul. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA ₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.....	81
Figura 3.6 -	Cariótipos corados com Giemsa das populações de <i>R. quelen</i> provenientes de A: Angra dos Reis e B: Mariápolis. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA ₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.....	82
Figura 3.7 -	Cariótipos corados com Giemsa das populações de <i>R. quelen</i> provenientes de A: Piquete e B: Araras. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA ₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.....	83
Figura 3.8 -	Metáfases somáticas de <i>R. quelen</i> , as setas indicam os sítios de DNAr 5S identificados através da FISH nas populações provenientes de A: Angra dos Reis, B: Araras, C: Botucatu, D: Rio do Oeste – Cascavel, E: Corrego Sangão – Cascavel, F: Colina, G: Guapiara, H: Iguape, I: Ipeuna, J: Mariápolis, K: Piquete, L: rio Paraíba do Sul, M: rio São José, N: Santo Antônio do Pinhal.....	84
Figura 3.9 -	Metáfases somáticas submetidas ao bandamento C das populações de <i>R. quelen</i> provenientes de A: Angra dos Reis, B: Araras, C: Botucatu, D: Rio do	85

Oeste – Cascavel, **E**: Corrego Sangão – Cascavel, **F**: Colina, **G**: Guapiara, **H**: Iguape, **I**: Ipeuna, **J**: Mariápolis, **K**: Piquete, **L**: rio Paraiba do Sul, **M**: rio São José, **N**: Santo Antônio do Pinhal. As setas indicam os cromossomos supranumerários.....

- Figura 3.10** - Esquema representativo do possível mecanismo de origem dos cromossomos supranumerários metacêntricos médios (Sm) em *R. quelen* a partir de um evento de não-disjunção (seta vermelha) de um cromossomo metacêntrico médio do complemento A. Após este processo os cromossomos supranumerários seguiram caminhos evolutivos independentes, de forma que estes ou permaneceram como cromossomos metacêntricos médios, ou passaram por processos que resultaram em alterações de seu tamanho e estrutura, tais como a perda de regiões eucromáticas (setas azuis) ou perda de regiões heterocromáticas (setas pretas). Na figura as regiões escuras indicam blocos de heterocromatina constitutiva..... 86
- Figura 4.1** - Gráficos da frequência 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) ND2, (d) região D-loop, (e) todas as regiões gênicas concatenadas. 111
- Figura 4.2** - Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a filogenia, assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se na Tabela 3 (Materiais e Métodos)..... 112
- Figura 4.3** - Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Os valores de *bootstrap* para 1000 replicações encontram- 113

se acima dos ramos. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos).....

- Figura 4.4 -** Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Árvore consenso das 449 árvores mais parcimoniosas obtidas. Os valores em vermelho correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em azul aos valores de índice de Bremer. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos)..... 114
- Figura 5.1 -** Topologia de Neighbor-Joining obtida para a análise parcial dos dados utilizando todas as regiões gênicas concatenadas. Os valores de *bootstrap* para 1000 replicações encontram-se acima dos ramos. Em detalhe Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a filogenia, assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos)..... 136
- Figura 5.2 -** Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia para a análise parcial dos dados com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Árvore consenso das seis árvores mais parcimoniosas obtidas. Os valores em vermelho correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em azul aos valores de índice de Bremer. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos)..... 137

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Estudos citogenéticos realizados no gênero <i>Rhamdia</i>	14
Tabela 2 -	Dados referentes à presença cromossomos de supranumerários em <i>Rhamdia</i>	15
Tabela 3 -	Listagem das espécies estudadas no presente trabalho e dos códigos de identificação dos exemplares utilizados nas análises filogenéticas.....	26
Tabela 4 -	Dados cromossômicos das populações de <i>R. quelen</i> analisadas no presente estudo.....	64
Tabela 5 -	Caracterização das regiões mitocondriais das amostras de <i>Rhamdia</i> analisadas no presente trabalho.....	98



Resumo e Abstract

Resumo

O gênero *Rhamdia*, popularmente conhecido como jundiá, pertence à família Heptapteridae, uma das maiores radiações de bagres neotropicais de água doce. Estes peixes de médio porte e hábitos oportunistas e noturnos são encontrados em pequenos rios e córregos. No passado, *Rhamdia* foi considerado um dos gêneros mais especiosos dentro de Siluriformes, contando com cerca de 100 espécies descritas. Entretanto, após uma revisão taxonômica recente o número de espécies desse gênero foi reduzido a 12. Dados genéticos, de natureza cromossômica e molecular, caracterizam o gênero *Rhamdia* como um grupo que apresenta grande diversidade, sugerindo a existência de “complexos de espécies”, principalmente para a espécie *R. quelen*, a única estudada do ponto de vista citogenético até o momento. No presente trabalho, foram utilizadas diferentes metodologias com o intuito de caracterizar cromossomicamente populações de diferentes espécies de *Rhamdia*, bem como estabelecer as relações evolutivas entre elas, contribuindo para o reconhecimento de padrões e processos evolutivos envolvidos em sua diferenciação. Foram analisados exemplares de *R. enfurnada*, *R. itacaiunas*, *R. laukidi* e *R. quelen*, provenientes das principais bacias hidrográficas da América do Sul, sendo somadas as análises sequências de genes mitocondriais de *R. cinerascens*, *R. guatemalensis* e *R. laticauda* provenientes do GenBank, totalizando sete das 12 espécies reconhecidas para o gênero. A análise de cinco regiões do genoma mitocondrial identificou a existência de 15 grupos bem definidos e com altos valores de suporte para o que hoje é reconhecido como *R. quelen*, confirmando a existência de um “complexo de espécies”. A divisão das espécies de *Rhamdia* em um grupo “Cis-Andino” e um grupo “Trans-Andino”, proposta anteriormente, também foi recuperada, embora o gênero não tenha sido confirmado como monofilético. Os dados citogenéticos permitiram o

estabelecimento de tendências de evolução cromossômica dentro do grupo e a sugestão de um possível mecanismo de origem e diferenciação dos cromossomos supranumerários. O presente trabalho reforça a importância da utilização de diferentes abordagens na realização de estudos taxonômicos e evolutivos, sugerindo uma nova revisão do gênero *Rhambdia* que leve em consideração os dados genéticos obtidos.

Abstract

The genus *Rhamdia*, popularly known as “jundiá”, belongs to the family Heptapteridae, one of the greatest radiations within neotropical freshwater catfish. This group of middle-sized fish of opportunistic behavior is found in small rivers and streams. In the past, *Rhamdia* was considered one of the most specious genera of Siluriformes, comprising about 100 described species. However, after a recent taxonomic review, the number of species within this genus was reduced to 12. Genetic data, whether chromosomal or molecular, have characterized the genus *Rhamdia* as a high diverse group, suggesting the existence of species complexes, mainly in *R. quelen*, the only species where cytogenetic data are available so far. In the present work, different methodologies were used in order to characterize cytogenetically populations of distinct species of *Rhamdia*, as well as their evolutionary relationships, thus contributing to the recognition of evolutionary patterns and processes involved in their differentiation. Specimens of *R. enfurnada*, *R. itacaiunas*, *R. laukidi* and *R. quelen*, from the main South-American hydrographic basins were analyzed, coupled with sequence analyses of the mitochondrial genes of *R. cinerascens*, *R. guatemalensis* and *R. laticauda*, available in the GenBank, thereby comprising seven of the 12 valid species in the genus. The analysis of five regions of mitochondrial genome identified 15 well-defined groups with high bootstrap values within the so-called *R. quelen*, confirming the occurrence of a species complex. The division of *Rhamdia* species into a Cis-Andean group and a Trans-Andean group, as previously proposed, was also revalidated, although the genus seems not to be monophyletic. The cytogenetic data allowed establishing trends of chromosomal evolution within the group and a hypothesis for the origin and differentiation of supernumerary chromosomes could be drawn. The present work

reinforces the importance of distinct approaches in taxonomic and evolutionary studies, suggesting a new revision within the genus *Rhamdia* that takes the present genetic data into account.



Introdução Geral

Introdução Geral

1.1 A Ordem Siluriformes e a família Heptapteridae

Os peixes compreendem um grupo rico e diverso de organismos. A ictiofauna de água doce Neotropical é extremamente numerosa e diversificada, com estimativas da existência, nesta região, de cerca de 8000 espécies, representando cerca de 25% de toda a diversidade da fauna de peixes mundial, tanto marinha quanto de água doce (Vari e Malabarba, 1998).

Os Siluriformes são popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis, entre outras denominações, e compreendem cerca de 2800 espécies, distribuídas em aproximadamente 485 gêneros e 38 famílias (Diogo, 2003; Nelson, 2006). Esse número é tido como bastante subestimado por diversos autores (Lundberg e Frei, 2003; Sullivan *et al.*, 2006), uma vez que a quantidade de espécies descritas aumenta constantemente.

Esta ordem de peixes pertence à Superordem Ostariophysi, e juntamente com as ordens Cypriniformes, Characiformes e Gymnotiformes formam a série Otophysi, que é subdividida em: Cypriniphysi (que inclui os Cypriniformes), Characiphysi, (que inclui os Characiformes) e Silurophysi (que inclui as ordens Siluriformes e Gymnotiformes)(Fink e Fink, 1996).

Morfologicamente, os Siluriformes podem ser facilmente identificados, pois possuem uma série de características distintivas, tais como: são peixes de corpo nu, o qual se encontra envolto por pele espessa ou coberto, total ou parcialmente, por placas ósseas (Britski *et al.*, 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal, portador de um acúleo forte e pungente. A nadadeira adiposa encontra-se usualmente presente, e é, em geral, bem desenvolvida. Há geralmente três pares de barbilhões sensitivos (Mees, 1974).

As espécies de peixes pertencentes a essa ordem podem apresentar desde pequeno até grande porte, possuindo, em sua maioria, hábitos sedentários (os quais contribuem para a grande dificuldade apresentada por estes peixes em superar cachoeiras ou corredeiras que se interpõem às suas raras migrações), sendo encontrados escondidos por entre as pedras e vegetação (Britski, 1981). Sua atividade é predominantemente crepuscular ou noturna, quando, utilizando-se de seus sentidos químicos (olfato e gustação), estes saem à procura de alimento (Sterba, 1973).

A maioria dos representantes concentra-se nas regiões neotropical e tropical. De certa forma, a distribuição desses animais parece ser limitada por fatores relacionados à temperatura da água, uma vez que são poucas as espécies encontradas nas regiões do extremo Sul da América do Sul ou extremo norte de América do Norte (Nelson, 2006). Embora a maioria dos Siluriformes seja encontrada em ambientes de água doce, existem exceções, como as famílias Ariidae e Plotosidae, que apresentam espécies marinhas (Lowe-McConnel, 1975), e as famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangassiidae, que incluem algumas espécies adaptadas à vida em ambientes estuarinos ou que apresentam certa tolerância a ambientes marinhos (de Pinna, 1998). Dessa maneira, os Siluriformes apresentam, praticamente, uma distribuição cosmopolita, sendo encontrados em todos os continentes, com exceção do continente Antártico (onde estão presentes na forma de fósseis). Esta ampla distribuição, associada à grande variedade de formas e hábitos apresentados por estes animais, torna os representantes dessa ordem um interessante grupo de pesquisa para estudos ecológicos, evolutivos e filogeográficos (Lundberg e Freil, 2003).

Por constituir um grupo tão amplo, a sistemática dos Siluriformes neotropicais permanece ainda bastante confusa, principalmente devido a falhas na identificação de espécies por conflitos taxonômicos e/ou pela falta de caracteres diagnósticos para

espécies muito semelhantes morfológicamente (Perdices *et al.*, 2002). Segundo Diogo (2003), a maioria dos estudos sistemáticos realizados na ordem é confusa, com as propostas de agrupamentos dos táxons baseando-se em caracteres plesiomórficos e/ou homoplásicos, que possuem pouco ou nenhum embasamento, embora não devam ser ignorados. Numa tentativa de melhor estabelecer as relações entre as famílias e espécies que compõem este grupo de peixes, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o intuito de determinar suas relações evolutivas e taxonômicas.

Diferentes filogenias morfológicas (de Pinna, 1993, 1998; Brito, 2003; Diogo, 2003) foram propostas para a ordem, as quais, apesar de apresentarem divergências quanto ao posicionamento e à relação entre algumas famílias (e seus representantes), concordam com o monofiletismo de Siluriformes, baseando-se para isso, em uma série de sinapomorfias anatômicas (Arratia *et al.*, 2003). Filogenias moleculares mais recentes, construídas com base em sequências de genes mitocondriais (citocromo b) e nucleares (rag 1 e rag 2), também confirmaram o monofiletismo da ordem e permitiram um melhor estabelecimento das relações evolutivas no nível intra-familiar, embora essas relações não tenham sido ainda plenamente resolvidas (Hardman, 2005; Sullivan *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos filogenéticos, centrados em níveis taxonômicos superiores, foi realizada em algumas poucas famílias, como Callichthyidae (Reis, 2003; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004), Doradidae (Moyer *et al.*, 2004), Ictaluridae (Hardman, 2004), Cetopsidae (de Pinna e Vari, 1995; de Pinna *et al.*, 2007), Pimelodidae (de Pinna, 1993, 1998; Hardman e Lundberg, 2006) e Ariidae (Betancur *et al.*, 2007).

A família Pimelodidae já foi considerada uma das maiores famílias de bagres Neotropicais, assim como a mais diversificada (Mees, 1974), sendo composta por cerca de 60 gêneros e mais de 300 espécies (Britski, 1981). Muitos autores propuseram que a

família Pimelodidae pudesse ser o provável grupo ancestral dos Siluriformes neotropicais, entretanto, as relações dentro deste grupo ainda não foram bem elucidadas (Lundberg e Friel, 2003).

Estudos realizados por Lundberg *et al.* (1991a, 1991b) e de Pinna (1998), reconheceram a existência de três grupos monofiléticos dentro de Pimelodidae, os quais eram equivalentes às subfamílias Pimelodinae, Heptapterinae (Rhamdiinae) e Pseudopimelodinae. Mais tarde, estes grupos foram elevados à categoria de família (Nelson, 2006; Ferraris, 2007). Essa divisão em três famílias é corroborada pelos dados citogenéticos, uma vez que cada família possui um número diplóide predominante característico, sendo esses $2n = 54$, 56 e 58 cromossomos, em Pseudopimelodidae, Pimelodidae e Heptapteridae, respectivamente (Swarça *et al.*, 2000; Garcia, 2005; Martinez *et al.*, 2008a).

A família Heptapteridae, endêmica da região neotropical, é uma das famílias mais representativas dentro da ordem Siluriformes. Esses peixes são encontrados em pequenos corpos de água desde o México até o sul da Argentina (Bockmann e Guazzelli, 2003) e, enquanto alguns de seus gêneros apresentam ampla distribuição pelos rios da América do Sul (de Pinna, 1998), algumas espécies de heptapterídeos são marcadas pelo endemismo ou pela presença de hábitos troglomórficos (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Os heptapterídeos, de forma geral, são solitários ou formam pequenos grupos (cerca de 10 indivíduos), sendo encontrados no fundo de pequenos corpos d'água ou escondidos na vegetação marginal. Esses animais não apresentam dimorfismo sexual aparente ou cuidado parental da prole, apresentam fertilização externa e possuem hábitos alimentares variados, sendo constituídos, em sua maioria, por formas carnívoras ou onívoras (Bockmann e Guazzelli, 2003). Esse grupo de peixes é caracterizado por possuir pequeno tamanho corpóreo, sendo que seus maiores representantes atingem, no

máximo, cerca de 20 cm de comprimento. Devido a este fato, Heptapteridae apresenta pouca ou nenhuma importância para a pesca, seja ela esportiva ou comercial (Bockmann e Guazzelli, 2003). Entretanto, alguns gêneros, como *Pimelodella* e *Brachyrhamdia*, são utilizados em aquarofilia e algumas espécies do gênero *Rhamdia* são empregadas em projetos de piscicultura (Salhi *et al.*, 2004).

Na filogenia morfológica proposta por de Pinna (1993) a família Heptapteridae foi confirmada como uma unidade monofilética, mostrando-se mais relacionada com a família de bagres asiáticos Bagridae do que com Pimelodidae e Pseudopimelodidae. Desta forma, as famílias Bagridae, Heptapteridae e Olyridae formariam a Subordem Heptapteroidei, enquanto Pimelodidae e Pseudopimelodidae pertenceriam às Subordens Eusiluroidei e Loricarioidei, respectivamente. Esta hipótese, entretanto, não foi corroborada nas filogenias obtidas por Britto (2003) e Diogo (2003) com base em dados morfológicos e nem nas filogenias obtidas com base em dados moleculares, onde Heptapteridae mostra-se mais relacionada com as famílias Pimelodidae e Pseudopimelodidae, formando juntamente com o gênero *Conorhynchos*, a superfamília Pimelodoidea, pertencente à subordem Siluroidei (Hardman, 2005; Sullivan *et al.*, 2006).

Após ser elevada à categoria de família, Heptapteridae passou a ser composta por 25 gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imperales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nannorhamdia*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis* e *Rhamdiopsis* (de Pinna, 1998). Entretanto, a composição genérica da família permanece em discussão, uma vez que, até pouco tempo, alguns de seus gêneros eram associados a outras famílias de Siluriformes, como, por exemplo, o gênero

Phreatobius, que devido a suas características associadas à vida em ambientes freáticos, constitui um dos grandes problemas sistemáticos dentre os Siluriformes.

Dentre os gêneros reconhecidos como válidos, apenas *Gladioglanis* (Lundberg *et al.*, 1991a) e *Mastiglanis* (Bockmann, 1994) foram diagnosticados com base em métodos filogenéticos, os demais gêneros foram estabelecidos com base em poucos caracteres morfológicos ou caracteres insuficientes, de forma que a maioria das classificações propostas possui pouco ou nenhum suporte (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Recentemente, os gêneros que compõem a família Heptapteridae foram revistos por Bockmann (1998). Esse estudo demonstrou que os gêneros *Brachyrhamdia*, *Caecorhamdella*, *Caecorhamdia*, *Imperales*, *Medemichthys*, *Nannorhamdia*, *Pimelonotus* e *Trophlobagrus*, eram, na verdade, sinônimas de outros gêneros da família, como *Rhamdia*, *Pimelodella* e *Imparfinis*. Para refletir os agrupamentos cladísticos obtidos em seus estudos, o autor propõe 11 novos gêneros (*Callimorhamdia*, *Dolichorhamdia*, *Maculirhamdia*, *Microrhamdia*, *Pseudeptapterus*, *Pseudocetopsorhamdia*, *Pseudomachamocranus*, *Pseudoleptorhamdia*, *Pseudoimperales*, *Pseudorhamdioglanis* e *Stewartglanis*) de forma que a família passou a ser composta por 31 gêneros. Na última revisão geral foram listados 26 gêneros e 186 espécies conhecidas e foi sugerida a existência de cerca de 50 espécies já conhecidas, porém não descritas (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Bockmann (1998) também propôs uma filogenia com base em dados morfológicos para a subordem Heptapteroidei, realizando o maior estudo das relações evolutivas em Heptapteridae até o momento. Na árvore filogenética obtida pelo autor (Fig. 1.1) a família Heptapteridae é recuperada como um grupo monofilético, enquanto que o monofiletismo de Bagridae só é corroborado com a inclusão de Olyridae como seu sub-grupo. O gênero *Goeldiella* foi considerado o mais basal para entre os

heptapterídeos. Com base nestes dados Bockmann (1998) propõe a subdivisão de Heptapteridae em duas tribos monofiléticas: Phreatobiini (que inclui os gêneros *Preatobius*, *Gladioglanis* e os demais gêneros que possuem os músculos *adductor mandibulae* hipertrofiados) e Heptapteriinae (que inclui os demais gêneros e a maior parte das espécies de pequeno porte). O autor também ressalta que, em alguns níveis, o cladograma obtido é pouco estável, e, dessa forma, pequenas modificações na codificação de alguns caracteres envolvidos na análise poderiam gerar uma topologia diferenciada.

Em paralelo aos problemas que envolvem a taxonomia dos gêneros de Heptapteridae, estão aqueles referentes à taxonomia de suas espécies. Até o momento, apenas os gêneros *Gladioglanis* (Lundberg *et al.*, 1991a), *Mastiglanis* (Bockmann, 1994), *Nemuroglanis* (Ferraris, 1988), *Rhamdia* (Silfvergrip, 1996), *Taunayia* (Oliveira e Britski, 2000) e *Rhamdella* (Bockmann e Miquelarena, 2008) foram estudados em detalhes, sendo que a maioria desses, ou é monotípica, ou compreende poucas espécies (Bockmann e Guazzelli, 2003).

A classificação das espécies de heptapterídeos também é bastante dificultada pela ocorrência de espécies crípticas, cujos caracteres morfológicos não são suficientes para sua correta distinção, constituindo grupos que são diferenciados, geralmente, com base em outros caracteres biológicos, como dados genéticos, bioquímicos ou ecológicos. As espécies crípticas são, em grande parte, associadas à ocorrência de “complexos de espécie”, caracterizados pela inclusão de diferentes espécies biológicas sob uma mesma nomenclatura taxonômica, sendo que, dentre os Siluriformes neotropicais são conhecidos alguns grupos caracterizados pela ocorrência destes complexos, cuja existência foi proposta com base em dados citogenéticos ou de natureza molecular,

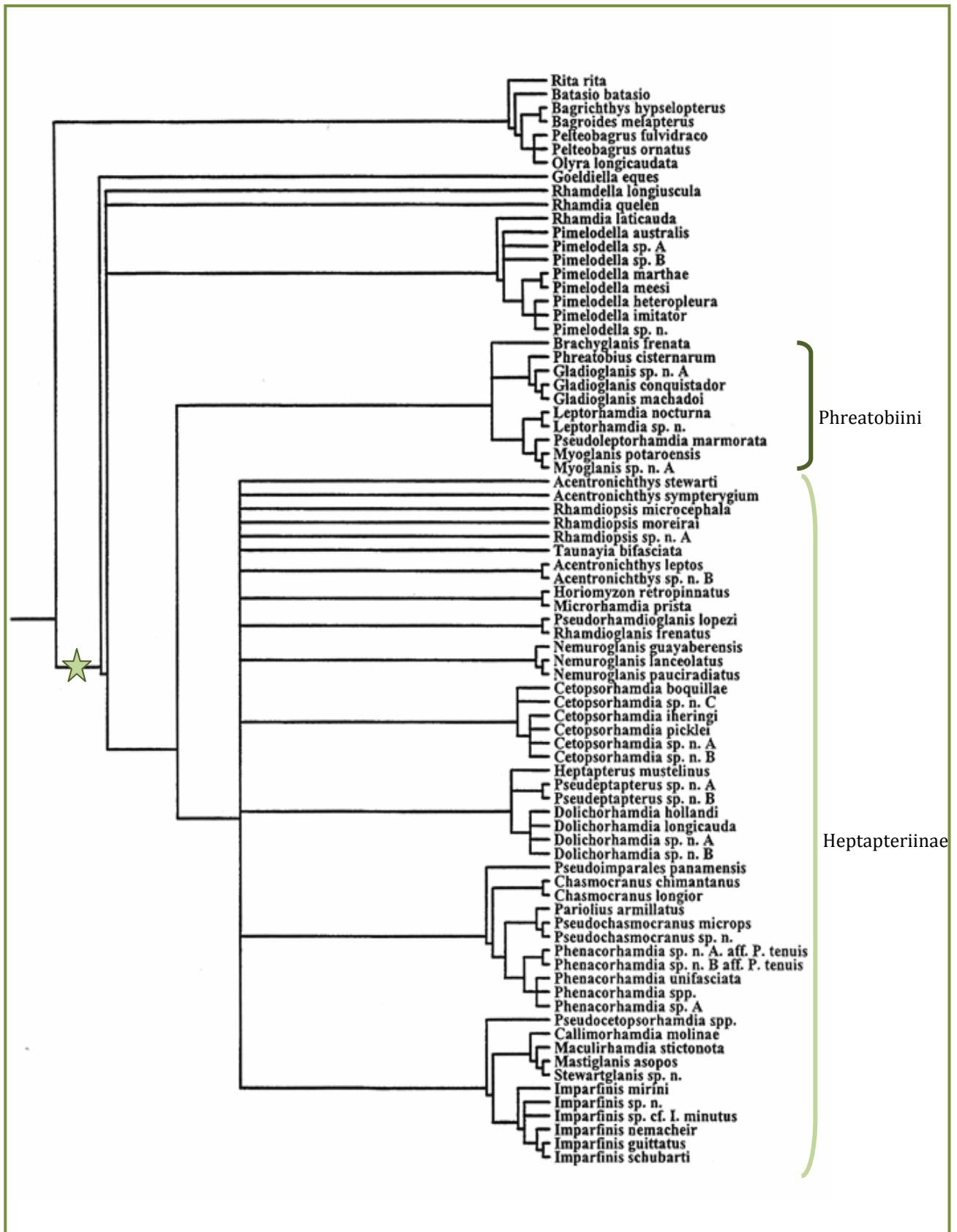


Figura 1.1: Hipótese das relações internas da família Heptapteridae (estrela), representada pelo cladograma de consenso estrito obtido por Bockmann (1998) com base em dados morfológicos.

como por exemplo: *Pimelodella chagresi* (Martin e Bermingham, 2000) e *Rhamdia quelen* (Perdices *et al.*, 2002).

1.2 O gênero *Rhamdia* (Bleeker, 1858)

1.2.1 Aspectos taxonômicos

Alguns gêneros pertencentes à família Hepapteridae encontram-se amplamente distribuídos pelas águas doces da América do Sul, destacando-se entre estes, o gênero *Rhamdia*, popularmente conhecido como jundiá, e que ocorre em praticamente em todas as bacias hidrográficas desta região. Entretanto, a distribuição do gênero é mais ampla, uma vez que estes animais podem ser encontrados desde o extremo sul do México até o sul da Argentina, cobrindo toda a extensão Neotropical (Silfvergrip, 1996).

Esses peixes são morfologicamente diferenciados de outros Siluriformes com base em uma série de caracteres únicos. Seu corpo é revestido por pele espessa (couro) e sua coloração é bastante variada, indo do pardo amarelado a diversos tons de cinza, com o ventre, em geral, mais claro; uma série de pequenas máculas irregulares pode ou não estar presente ao longo de todo o corpo do animal, bem como uma lista transversal mais escura que se prolonga da base do olho até a base da nadadeira caudal. Estão presentes três pares de barbilhões sensitivos com tamanhos diferenciados entre si, uma longa nadadeira adiposa com a margem posterior livre, fontanelas posteriores fechadas, processos humorais bem desenvolvidos e ausência de dentes no vômer. Estes peixes podem atingir até 40 centímetros de comprimento e dois quilogramas de peso, porém, a maioria dos exemplares apresenta cerca de 20-30 centímetros. *Rhamdia* é um dos muitos gêneros de Siluriformes que não apresentam dimorfismo sexual aparente ou dispensam cuidado com a prole. Com relação aos hábitos alimentares, estes peixes consistem em formas onívoras e de comportamento oportunista. Os Jundiás são

possuidores de uma carne saborosa e com poucos espinhos, sendo que seu cultivo apresenta um custo de produção relativamente baixo (Silfvergrip, 1996; CEPEN, 2005).

O monofiletismo do gênero *Rhamdia* nunca foi confirmado. Esse gênero foi considerado o mais especioso dentro da família Pimelodidae, contando com cerca de 100 espécies válidas, o que equivalia a cerca de um quarto do total de espécies que compunham essa família (Silfvergrip, 1996)(o autor considerou a atual família Heptapteridae como parte integrante da família Pimelodidae).

Silfvergrip (1996) realizou a mais recente revisão do gênero *Rhamdia*. Até a realização desse trabalho, o gênero não havia sido alvo de uma revisão mais refinada, de forma que os dados sistemáticos disponíveis eram baseados em estudos realizados em poucos exemplares e que contavam com uma delimitação geográfica falha, de forma que a distribuição do gênero nunca foi estudada. Alguns desses estudos tinham como base apenas dados literários. Para a sua revisão, Silfvergrip adotou o conceito tipológico de espécie e procurou estudar o máximo de exemplares possível, de forma a cobrir toda a distribuição atribuída ao gênero *Rhamdia*, comparando pela primeira vez essa parte da ictiofauna da América Central com a ictiofauna da América do Sul. O autor também não reconheceu populações troglóbias de *Rhamdia* como espécies distintas, sinonimizandolas em *R. laticauda* ou *R. quelen*, uma vez que para ele as características relacionadas à vida em ambiente cavernícola podem surgir em diferentes populações, independentemente, resultando em fenótipos extremamente similares (paralelismo); e também pela dificuldade em determinar se características morfológicas intermediárias epígeas/troglomórficas seriam ou não resultado de cruzamento com formas migrantes ou efeito de endocruzamento.

Com base nesta revisão, 100 espécies nominais de *Rhamdia* foram então agrupadas em 11 espécies: *R. foina*, *R. humilis*, *R. itacaiunas*, *R. jequitinhonha*, *R. laukidi*,

R. laticauda, *R. muelleri*, *R. nicaraguensis*, *R. poeyi*, *R. quelen* e *R. xetequepeque*. Dessas, sete espécies são descritas para as bacias hidrográficas brasileiras: *R. foina*, *R. itacaiunas*, *R. jequitinhonha*, *R. laukidi*, *R. muelleri*, *R. poeyi* e *R. quelen* (Silfvergrip, 1996). Bockmann (2007) adiciona, ainda, a espécie troglóbia *R. enfurnada* à lista de espécies válidas, totalizando oito espécies de *Rhamdia* encontradas no Brasil.

A proposta de Silfvergrip (1996) não foi publicada, e não é aceita por muitos taxonomistas, que julgam o estudo como pouco acurado. O próprio autor reconhece a falta de caracteres diagnósticos robustos na identificação de espécies de Siluriformes e ressalta que um dos motivos de falhas neste processo está justamente na falta de estudos que englobem a distribuição total de uma espécie, uma vez que para ele, populações muito distantes geograficamente podem apresentar características morfológicas que sugiram sua diferenciação. Porém, quando populações ao longo dessa distribuição são amostradas, o que se observa é uma gradação (*cline*) dessas características, o que, por sua vez, descarta a possibilidade da existência de duas espécies distintas.

A espécie *R. quelen*, é a espécie do gênero que apresenta maior distribuição geográfica, sendo encontrada desde o Sul do México até o sul da Argentina. Atualmente, essa espécie é sinonímia para outras 47 espécies, incluindo formas troglóbias. No Brasil, está descrita para praticamente todas as bacias hidrográficas, principalmente as do Sul e Sudeste, podendo ser encontrada, inclusive, em simpatria com outras espécies de *Rhamdia* (Silfvergrip, 1996).

De forma geral, a sistemática do gênero *Rhamdia* é ainda bastante confusa, principalmente por causa de falhas na identificação de espécies devido a conflitos taxonômicos (Perdices *et al.*, 2002).

1.2.2 Estudos citogenéticos

O primeiro estudo citogenético no Brasil envolvendo representantes da família Heptapteridae foi desenvolvido por Toledo e Ferrari (1976), os quais analisaram espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia*.

Mais recentemente, outros estudos citogenéticos vêm sendo realizados nessa família, utilizando além das técnicas clássicas, técnicas de citogenética molecular, visando uma melhor caracterização cromossômica dos heptapterídeos. Entretanto, dados dessa natureza para o grupo continuam ainda escassos, sendo poucas as espécies estudadas até o momento. Apesar das poucas informações disponíveis, é possível verificar que o número diplóide dentro desta família pode variar de 42 (Margarido e Moreira-Filho, 2008) a 62 cromossomos (Toledo e Ferrari, 1976), com predomínio de $2n = 58$ cromossomos.

Com relação ao número fundamental (NF), este é relativamente alto, variando de 84, encontrado em *Pimelodella* sp. (Toledo e Ferrari, 1976) a 116, detectado em *Rhamdia* (Maistro *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2003), fato relacionado ao predomínio de cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntricos na constituição cariotípica. Os cromossomos destes grupos de peixe apresentam, de modo geral, pequeno tamanho, o que contribui para a dificuldade na identificação de sua morfologia e localização de bandas.

Relatos da ocorrência de polimorfismos estruturais e numéricos em Heptapteridae vêm sendo frequentemente descritos, como por exemplo, polimorfismos envolvendo blocos heterocromáticos (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Almeida-Toledo e Garcia, 2008), triploidias naturais (Garcia *et al.*, 2003; Silva, *et al.*, 2008), cromossomos supranumerários ou B (Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Almeida-Toledo e

Garcia, 2008; Tabela 2) e sistemas cromossômicos sexuais simples do tipo XX/XY (Dias e Foresti, 1993; Almeida-Toledo e Garcia, 2008)

Levando-se em consideração a reorganização taxonômica para gênero *Rhamdia* proposta por Silfvergrip (1996) e Bockmann (2007), os dados citogenéticos resumidos nessa seção, serão sumarizados às espécies reconhecidas como válidas por esses autores. Porém, o nome antigo das espécies também pode ser encontrado nas Tabelas 1 e 2, as quais resumem os dados citados. Dessa forma, das 12 espécies válidas de *Rhamdia*, apenas *R. quelen* possui dados citogenéticos disponíveis na literatura.

As populações de *R. quelen* analisadas até o presente momento apresentaram o número diplóide conservado de $2n = 58$ cromossomos, marcado por acentuada variabilidade no que diz respeito à constituição cariotípica e freqüente presença de cromossomos supranumerários (Tabelas 1 e 2).

Os cromossomos supranumerários ou cromossomos B são cromossomos adicionais e dispensáveis, presentes em alguns indivíduos e em algumas populações. Esses cromossomos originaram-se, provavelmente, dos cromossomos do complemento padrão, mas seguem sua própria evolução, não constituindo elementos essenciais ao desenvolvimento (Camacho, 1993).

Os casos de presença de cromossomos supranumerários em heptapterídeos ainda são pouco freqüentes, estando restritos apenas a alguns gêneros. Dentro desta família já foi identificada ocorrência destes cromossomos em espécies de *Pimelodella* (Almeida-Toledo *et al.* 1992; Almeida-Toledo e Garcia, 2008) e em *R. quelen*, a qual apresenta uma marcante ocorrência deste tipo de polimorfismo (Tabela 2).

Tabela 1: Estudos citogenéticos realizados no gênero *Rhamdia*.

<i>Rhamdia quelen</i>	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	NF	RONs	Tipo de RONs/ Het. tamanho	Referências
<i>R. brannei</i>	R. Iguaçú – PR	58	36m + 14sm + 4st + 4a	112	Braço curto, a (par 29), braço longo, st	Múltiplo	Abucarma e Martins-Santos (2001)
	R. Iguaçú – PR	58	30m + 10sm + 14st + 4a	112	Braço curto, st	Simple	Roman <i>et al.</i> (2002)
<i>R. hilarii</i>	R. da Onça – SP	62		116			Toledo e Ferrari (1976)
	Rep do Monjolinho – SP	58		≥ 100	Terminal, m/sm	Simple/Presente	Fenocchio (1993)
	Lagoa Nova e Jataí – SP	58					Fenocchio (1993)
	C. Hortelã – SP	58	30m + 18sm + 10st	106	Braço curto, (par 19)	Simple	Vissoto <i>et al.</i> (1999)
	Rep do Lobo – SP						
	R. Mogi-Guaçu – SP	58		≥ 100	Braço curto, st	Simple/Presente	Fenocchio (2000)
	Rep de Três Marias - MG						
	R. Aguapey - Argentina						
<i>R. quelen</i>	R. Mogi-Guaçu – SP	58	58m/sm	116	Braço curto, st	Simple/Presente	Maistro <i>et al.</i> (2002)
	R. Iguaçú – PR	58	26m + 16sm + 8st + 8a	108	Braço curto, st	Simple	Fenocchio <i>et al.</i> (2003)
<i>R. quelen</i>	L. dos Quadros, R. Guaíba – RS	58	52m + 6a	110	Braço curto, a	Simple/Presente	Hoechberg e Erdtmann (1988)
	R. Mogi-Guaçu – SP						
	R. Iguaçú – PR	58		≥ 100	Braço curto, st	Simple/Presente	Fenocchio <i>et al.</i> (2000)
	R. Paraná – Argentina						
	R. Tigagi – PR	58			Terminal, sm	Simple	Carvalho e Dias (2001)
	C. Maringá - PR	58	26m + 20sm + 6st + 6a	110	Braço curto, st	Simple	Stivari <i>et al.</i> (2004)
	R. Taquarussu - SP	58	26m + 22sm + 6st + 4a	110	Braço curto, st	Simple	Stivari <i>et al.</i> (2004)
	R. Paraná – Argentina	58	26m + 16sm + 8st + 8a	108	Braço curto, st	Simple	Fenocchio <i>et al.</i> (2003)
	Fazenda Harmonia - MS	58	36m + 6sm + 6st	116	Braço curto, sm (par 20)	Simple	Moraes <i>et al.</i> (2007)
	Ribeirão do Negros - SP	58	18m + 18sm + 16st + 6a	110	Braço curto, a	Simple	Martinez <i>et al.</i> (2008b)
Usina Ney Braga - RS	58	24m + 14sm + 14st + 6a	110	a	Simple	Silva <i>et al.</i> (2008)	
<i>R. sapo</i>	Buenos Aires – Argentina	58	44m/sm + 14st/a	102			Varcacel <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhamdia</i> sp.	R. Sapucaí -MG	58				Múltiplo	Andrade <i>et al.</i> (1998)
	R. Iguaçú – PR	58	36m + 14sm + 4st + 4a	112	Braço curto, a (par 29), braço longo, st	Múltiplo	Abucarma e Martins-Santos (2001)
	R. São João – PR	58	26m + 10sm + 10st + 12a	104	Terminal (par 27)	Simple	Roman <i>et al.</i> (2001)
	C. Grande – B. do Paraíba do Sul	58	46m/sm + 12st	116	Terminal (par 27)	Simple/Presente	Garcia <i>et al.</i> (2003)
<i>R. voulezi</i>	R. Iguaçú	58	36m + 14sm + 4st + 4a	112	Braço curto, a (par 29),	Simple	Abucarma e Martins-Santos (2001)
			30m + 10sm + 14st + 4a	112	Terminal (par 28)		Roman <i>et al.</i> (2001)

Legenda: 2n = número diplóide, NF = número fundamental, RONs = regiões organizadoras de nucléolo, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico. (Obs: o NF de todas as espécies foi recalculado para uma padronização da tabela, para tal os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos foram considerados como portadores de dois braços e os cromossomos acrocêntricos como portadores de apenas um braço cromossômico).

Tabela 2: Dados referentes à presença cromossomos de supranumerários em *Rhamdia*.

<i>Rhamdia quelen</i>	Nº de indivíduos estudados	Nº de indivíduos c/ supranumerários	Nº de supranumerários	Tamanho	Referência
<i>R. branneri</i>	13	12	0-4	médio	Abucarma e Martins-Santos (2001)
	-	-	0-4		Roman <i>et al.</i> (2002)
<i>R. hilarii</i>	51	50	0-5	pequeno	Fenocchio e Bertollo (1990)
	17	3	0-3	pequeno	Vissoto <i>et al.</i> (1999)
	29	-	0-3	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
	33	-	0-5	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
	1	-	2	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
	11	-	0-2	médio	Maistro <i>et al.</i> (2002)
<i>R. quelen</i>	30	9	0-4	médio	Hochberg e Erdtmann (1988)
	1	-	4	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
	3	-	0-1	médio	Fenocchio e Bertollo (2000)
	7	1	0-4	-	Carvalho e Dias (2001)
	20	-	1-4	médio,	Stivari <i>et al.</i> (2004)
	9	9	0-4	pequeno/ micro	Garcia (2005)
	4	4	0-3	médio	Moraes <i>et al.</i> , (2007)
	-	-	0-2	-	Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>R. sapo</i>	12	-	0-1	pequeno	Varcachel <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhamdia sp</i>	4	2	0-2	micro	Abucarma e Martins-Santos (2001)
	13	10	0-4	médio, micro	Garcia <i>et al.</i> , 2003
<i>R. voulezi</i>	4	3	0-4	médio	Abucarma e Martins-Santos (2001)

O número de cromossomos supranumerários em *R. quelen* pode variar entre um e sete cromossomos, sendo mais freqüente a presença de até dois desses elementos. Os supranumerários podem variar em tamanho (de micro a médios), podendo apresentar-se total (Hochberg e Erdtmann, 1988; Vissoto *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2003; Garcia, 2005) ou parcialmente heterocromáticos, sendo que as regiões terminais de ambos os braços cromossômicos são portadoras de blocos banda C positivos (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000; Maistro *et al.*, 2002), ou ainda totalmente eucromáticos (Abucarma e Martin-Santos, 2001; Moraes *et al.*, 2007).

As RONS são geralmente do tipo simples, ocorrendo nos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos e, freqüentemente, pode-se observar um

heteromorfismo de tamanho envolvendo estas regiões entre os homólogos. Embora raros, relatos de sistemas múltiplos de RONS também já foram descritos para duas populações do gênero (Tabela 1). De modo geral, as espécies estudadas de *Rhamdia*, apresentam pouca quantidade de heterocromatina, a qual se encontra distribuída predominantemente nas regiões centroméricas e teloméricas, sendo visualizada na forma de bandas pálidas e de difícil observação (Swarça *et al.*, 2003).

A aplicação de fluorocromos GC-específicos (Fenocchio *et al.*, 2002, Maistro *et al.*, 2002, Garcia *et al.*, 2003; Stivari e Martins-Santos, 2004; Moraes *et al.*, 2007) demonstrou que as regiões das RONS fluorescem intensamente quando coradas por esses fluorocromos, sendo que nenhuma outra marcação adicional foi encontrada. Já a coloração por DAPI, um fluorocromo com afinidade por regiões ricas em bases AT, tem resultado em um complemento cromossômico homogeneamente corado (Garcia, 2003; Garcia 2005; Moraes *et al.*, 2007).

Técnicas citogenéticas mais recentes, como a hibridação *in situ* fluorescente, têm sido utilizadas em poucos heptapterídeos, sendo que seu uso restringe-se à aplicação de sondas de DNAr 18S e 5S. Estudos realizados por Garcia *et al.* (2003) em uma população proveniente do Rio Grande, identificaram, através do uso da sonda de DNAr 18S, um sinal fluorescente bem visível, localizado nos braços curtos de um par de cromossomos do tipo subtelocêntrico. O mesmo foi observado para uma população de *R. quelen* do rio São Francisco (Garcia, 2005). Os sinais fluorescentes obtidos através da aplicação da sonda de DNAr 5S localizaram-se em posição pericentromérica de um par de cromossomos do tipo meta/submetacêntricos, indicando um conservadorismo interpopulacional de número e localização destes sítios ribossômicos dentro da espécie (Garcia *et al.*, 2003; Garcia, 2005).

Os dados cromossômicos demonstram uma grande variabilidade cariotípica para *R. quelen*, tanto intra e interpopulacional. Mesmo levando-se em conta a classificação antiga destes animais, nota-se a presença de cariogramas diferenciados entre populações de uma mesma espécie, e essa variação torna-se ainda maior quando as espécies são sinonimizadas. Esse fato, associado aos problemas taxonômicos enfrentados pelo grupo, sugere a existência de complexos de espécie e/ou espécies crípticas para o gênero *Rhamdia*, uma vez que a presença de número ou constituição cromossômica diferenciados pode funcionar como um mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies e formas híbridas ainda não foram observadas.

1.2.3 Estudos moleculares

Os estudos moleculares com enfoque em representantes de Heptapteridae são ainda mais escassos do que os estudos citogenéticos. A maioria dos estudos dessa natureza está relacionada à aplicação de alguns marcadores moleculares, como os microssatélites (Moeser e Bermingham, 2005) e análises de sequências gênicas (Bermingham e Martin, 1998; Martin e Bermingham, 2000; Hardman e Lundberg, 2006).

Com o intuito de desenvolver marcadores capazes de determinar as relações intra e inter-populacionais entre os estoques naturais de *R. quelen* encontrados na bacia do Alto rio Paraná, Alves *et al.* (2006), isolaram e testaram doze sequências de microssatélites. Estes estudos, ainda em seu início, mostram que alguns dos locos isolados são polimórficos e poderão futuramente ser aplicados a estudos envolvendo a espécie, fornecendo indicações para o delineamento de estoques para uso no cultivo e em programas de repovoamento.

Ribolli *et al.* (2008) utilizaram seis locos de microssatélites, obtidos de outras espécies de Siluriformes, para o estudo da diversidade genética de populações de *R.*

quelen provenientes de diferentes localidades da bacia do rio Uruguai. Os resultados obtidos indicaram estruturação populacional e, em algumas populações, um alto nível de endogamia. Segundo os autores, os resultados observados são condizentes com as quedas d'água presentes na região e que funcionariam como uma barreira física entre estas populações.

Os primeiros estudos utilizando sequências de genes mitocondriais para o estudo das relações filogenéticas entre espécies de *Rhamdia* foi realizado por Perdices *et al.* (2002). O gênero *Rhamdia* é o único gênero da família Heptapteridae presente na América Central e cujas espécies apresentam distribuição simpátrica. Em uma tentativa de determinar a história evolutiva do gênero na América Central e verificar se a distribuição atual de suas espécies nessa área é resultado de eventos de colonização independente a partir da América do Sul, ou produto de radiação adaptativa, os autores utilizaram sequências dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8 e Citocromo b para reconstruir a filogenia das espécies. Para o delineamento de seu trabalho, os autores adotaram a classificação proposta na revisão taxonômica de Silfvergrip (1996), na qual três espécies de *Rhamdia* são encontradas na América Central, *R. laticauda*, *R. nicaraguensis* e *R. quelen*. Diversas amostras dessas três espécies foram coletadas em cerca de 50 drenagens ao longo de toda essa região. Exemplos de *R. quelen* provenientes da América do Sul também foram incluídos nas análises.

As análises filogeográficas permitiram a distinção de múltiplas linhagens de DNA mitocondrial (DNAm_t), indicando forte estruturação geográfica, embora a divergência entre as sequências de espécimes de uma mesma localidade tenha sido baixa ou ausente. Os estudos filogenéticos mostraram a existência dois grandes clados para a América Central, o denominado "clado *laticauda*", formado pelas amostras de *R. laticauda* e *R. nicaraguensis*; e o denominado "clado *guatemalensis*", formado pelas amostras de *R.*

quelen provenientes da América Central. Esses dois clados formaram, junto com um terceiro grupo, o “clado *cinerascens*”, composto por *R. quelen* proveniente do Equador, um grande clado monofilético, chamado pelos autores de “clado Trans-Andino”. Como grupo irmão do “clado Trans-Andino” tem-se o “clado Cis-Andino”, formado pelos indivíduos de *R. quelen* provenientes da América do Sul (bacias do Orinoco, Amazonas e Paraná). A estimativa do tempo de divergência entre as espécies estudadas demonstrou que o gênero *Rhamdia* teve origem na América do Sul, e, possivelmente, invadiu a América Central na época da formação dos Andes (oito milhões de anos), sendo que, posteriormente, por volta de dois milhões de anos depois, este teria se diferenciado nos clados atuais.

Os dados obtidos por Perdices *et al.* (2002) são interessantes, pois demonstraram que a classificação proposta por Silfvergrip (1996) é falha em diversos pontos, indicando que algumas espécies reconhecidas como válidas pelo autor, na verdade não o são, enquanto outras espécies que foram sinonimizadas precisariam ser revalidadas. Uma outra questão envolve a distribuição de *R. quelen*, que de acordo com os dados de DNAm não atingiria a América Central, sendo restrita à América do Sul. Os dados moleculares também indicam a existência de diferentes linhagens evolutivas dentro do clado Cis-Andino, indicando que *R. quelen*, sob a classificação taxonômica atual, compreenderia um possível complexo de espécies.

1.3 Aplicação do sequenciamento de genes mitocondriais nos estudos das relações evolutivas em peixes, com ênfase em Siluriformes

Uma técnica cada vez mais utilizada em estudos evolutivos é o sequenciamento de DNA, tanto de genes nucleares como de genes mitocondriais. Esses dados têm sido aplicados no estudo das relações filogenéticas, tendo como base a variação nas bases

nitrogenadas em determinada posição da molécula de DNA. Dentre os diferentes marcadores moleculares, o DNAm_t tem sido bastante aplicado em estudos de relações genéticas, tanto em populações naturais (Moysés e Almeida-Toledo, 2002; Prioli *et al.*, 2002; Moyer *et al.*, 2004) quanto em populações cultivadas de peixes (Barroso *et al.*, 2005; Li e Gui, 2007; Kubota *et al.*, 2007).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela fosforilação oxidativa, uma das vias bioquímicas mais importantes da produção de ATP. Admite-se que, assim como os cloroplastos, as mitocôndrias tiveram sua origem em uma possível relação simbiótica com células eucariontes primitivas (Boore, 1999). Esta organela possui um genoma próprio, composto por uma molécula circular única, dupla fita, sem íntrons e de tamanho variável (15.000 a 17.000 pares de bases). A organização básica do DNAm_t em alguns grupos de vertebrados é considerada conservada e possui cerca de 37 genes, destes, 24 envolvidos com o mecanismo de transcrição do próprio DNAm_t (22 RNAs e dois RNAs) e 13 que codificam polipeptídeos: 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 (Fig. 2)(Meyer, 1994). Em algumas espécies de peixes a organização do mitogenoma é diferenciada, e geralmente esta mudança envolve genes de RNAt ou o tamanho da região D-loop (Miya *et al.*, 2003; Mabuchi *et al.*, 2004) (Fig. 1.2).

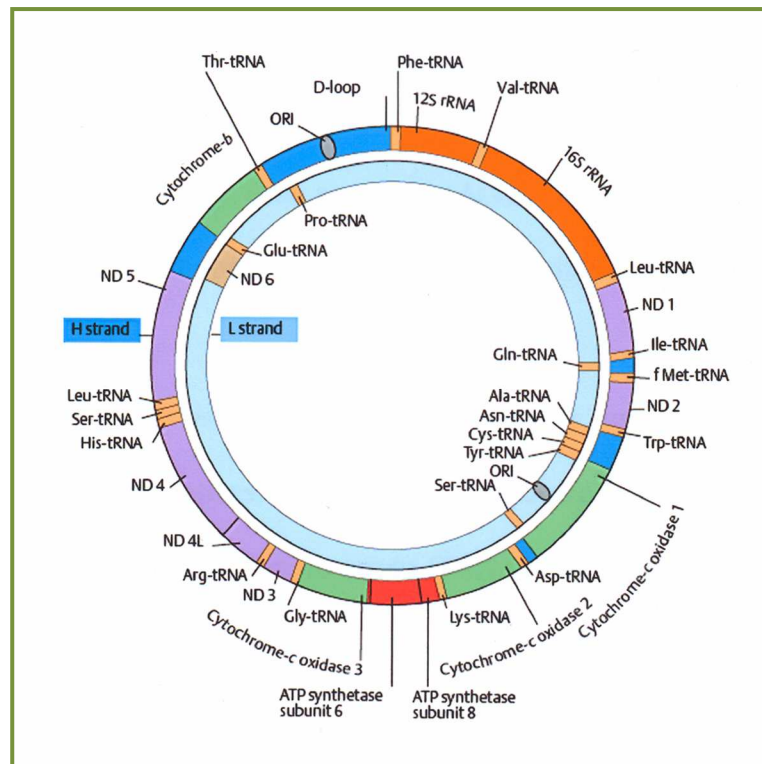


Figura 1.2: Esquema ilustrativo da organização do genoma mitocondrial em vertebrados
 Fonte: Passarge (1995).

Algumas características são particulares do DNA mitocondrial e o tornam uma excelente ferramenta para estudos genéticos e evolutivos, entre elas destacam-se: 1) presença de herança predominantemente materna e não Mendeliana; 2) geralmente não sofre recombinação; 3) possui uma organização altamente compacta; e 4) seus 22 RNAs transportadores (RNAts) são suficientes para codificar completamente os RNAs mensageiros (RNAs), 5) alta taxa de evolução em relação ao DNA nuclear (Garesse *et al.*, 1997).

O DNAm é um marcador molecular eficiente em análises intra e inter-específicas. Entre suas possíveis aplicações incluem-se estimativas do grau de variabilidade genética (Avice, 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 &

Awise, 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, Hrbek *et al.*, 2006). Análises com DNAm têm fornecido valiosas contribuições para a sistemática filogenética dos Siluriformes (Moyer *et al.*, 2004; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004; Hardman, 2005; Hardman e Lundberg, 2006; Koblmuller *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2006), bem como na resolução ou na identificação de conflitos taxonômicos (Martin e Bermingham, 2000; Perdices *et al.*, 2002; Vergara *et al.*, 2008).

Atualmente, o número de trabalhos que associam marcadores mitocondriais e nucleares está em expansão, tanto em estudos de estrutura populacional e fluxo gênico (Fitzsimmons *et al.*, 1997; Orbach & Gaffney, 2000) quanto em estudos filogenéticos (Pereira *et al.*, 2002; Calcagnotto *et al.*, 2005). Segundo Doyle (1992), a congruência entre as topologias obtidas por diferentes conjuntos de dados sugere que a árvore de genes reflete a árvore de espécies, ou seja, a reconstrução filogenética baseada em um grande conjunto de dados produz resultados mais robustos do que aquela baseada em um pequeno conjunto de dados. Quando as topologias são incongruentes, alguns genes ou regiões gênicas podem não estar sendo úteis para a reconstrução filogenética, devido às diferenças nas suas taxas evolutivas (Pereira *et al.*, 2002).

Estudos combinando a análise de sequências mitocondriais e nucleares em Siluriformes são bastante utilizados na determinação das relações filogenéticas (Hardman e Page, 2003; Hardman e Lundberg, 2006; Moyer *et al.*, 2007) e em estudos de filogeografia (Montoya-Burgos, 2003; Betancur *et al.*, 2007). Muitos destes estudos também fazem uso de dados morfológicos, comparando as filogenias obtidas e suas

congruências (Betancur *et al.*, 2007; Chiachio *et al.*, 2008), o que pode auxiliar na determinação da relação sistemática dos grupos envolvidos e até mesmo na realocação taxonômica de seus integrantes (Chiachio *et al.*, 2008).

1.4 Objetivos

Entre os grupos de peixes neotropicais de água doce, as espécies do gênero *Rhamdia* apresentam um interessante problema a ser analisado, uma vez que esse grupo consiste num conjunto de prováveis espécies crípticas de difícil identificação e, desse modo, sua sistemática é ainda bastante confusa. Com base nos dados citogenéticos agrupados nas Tabelas 1 e 2, associados a estudos empregando marcadores moleculares (Perdices *et al.*, 2002), fica claro que o gênero *Rhamdia* é composto por diferentes espécies ou subespécies geográficas que, embora semelhantes na aparência, constituem grupos genéticos diferentes. Nessas espécies, as análises cromossômicas e moleculares podem fornecer importantes informações.

Para realização do presente trabalho, seguiu-se a proposta taxonômica de Silfvergrip (1996), porém, diferentemente deste autor, adotou-se o conceito filogenético de espécie. Em vista destes dados, o presente estudo buscou:

1. Realizar estudos cariotípicos em populações de *R. quelen* pertencentes a diversas bacias hidrográficas brasileiras, e quando possível estender esses estudos a outras espécies do gênero, buscando comparar os dados obtidos com os dados disponíveis na literatura e desta forma tentar determinar os eventos envolvidos na diferenciação cromossômica do grupo;
2. Caracterizar os cromossomos supranumerários, cuja presença é marcante em *R. quelen*, a fim de melhor entender seu processo de diferenciação e sua possível

origem, bem como identificar se estes cromossomos estariam presentes em outras espécies do gênero;

3. Através do estudo de fragmentos de diferentes genes e da região controle D-loop do mitogenoma, contribuir para o entendimento das relações filogenéticas relativas a esse grupo, e também com informações que possam auxiliar futuros estudos taxonômicos destes peixes.



Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

2.1 Locais de coleta e material utilizado

O material utilizado no presente estudo, em grande parte, provém de excursões científicas realizadas pela equipe do Laboratório de Ictiogenética – USP. Outros pesquisadores, como a profa. Dra. Eleonora Trajano (Departamento de Zoologia – USP), prof. Dr. Claudio de Oliveira (Departamento de Morfologia –UNESP Botucatu), prof. Dr. Orlando Moreira-Filho (UFScar) e M.Sc. Pedro Hollanda (MUZUSP), colaboraram com o presente trabalho através de doações de amostras de tecido e/ou exemplares vivos.

Foram analisadas amostras de *R. quelen* provenientes de algumas das principais bacias hidrográficas brasileiras e exemplares de *R. enfurnada*, *R. itacaiunas* e *R. laukidi*. Nas análises filogenéticas foram incluídas sequências de genes mitocondriais de *R. cinerascens*, *R. guatemalensis*, *R. laticauda* e *R. quelen* provenientes do trabalho de Perdices *et al.*, (2002) e disponíveis no GENE BANK. As espécies e localidades estudadas estão indicadas na Tabela 3.

Os espécimes vivos, coletados ou doados, 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% e identificados no Museu de Zoologia da USP (estes, porém, não foram depositados no mesmo e encontram-se disponíveis no Laboratório de Ictiogenética da Universidade de São Paulo). Os exemplares de *R. enfurnada*, após preparo citogenético e retirada de tecidos, foram devolvidos ao grupo da professora Dra. Eleonora Trajano.

Tabela 3: Listagem das espécies estudadas no presente trabalho e dos códigos de identificação dos exemplares utilizados nas análises filogenéticas.

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	Dados de GPS	Nº amostral	Citogenética	Código	DNA mitocondrial			
							Atpase 6 e 8	Cyt b	ND2	D-loop
<i>R. enfurnada</i>	Gruna do Enfurnado/01 – BA	S. Francisco	S 13°38'44" W 44°12'05.9"	3♀, 6?	X	enfBA1	X	X	X	X
	Gruna do Enfurnado/21-24 – BA	S. Francisco	S 13°38'44" W 44°12'05.9"	6♀, 3♂, 2?	X	enfBA1	X	X	X	X
	Gruna do Enfurnado/15 – BA	S. Francisco	S 13°38'44" W 44°12'05.9"	2♂	X	enfBA1	X	X	X	X
	Gruna do Enfurnado/Babetes – BA	S. Francisco	S 13°38'44" W 44°12'05.9"	1♀, 1♂	X	enfBA1	X	X	X	X
<i>R. itacaiunas</i>	Rib. Água Limpa/Canarana - MT	Xingu	S 13°28'07" W 52°14'54"	1?	-	itaMT1	X	X	X	-
<i>R. laukidi</i>	Igarapé Ya-Mirim/São Gabriel da Cachoeira - AM	Amazonas	S 00°16.15,5" W 66°38.21,9"	1?	-	lauAM1	X	X	X	X
<i>R. quelen</i>	Lapa do Peixe/ Serra do Ramalho – BA	S. Francisco	S 13°49'21,78" W 43°57'24,39"	3♀, 2?	X	qlnBA1	X	X	X	X
	Riacho Rosário/Canavieiras - BA	Atlântico	S15°26'20,46" W 38°59'15,8"	1?	-	qlnBA2	X	X	X	X
	Espírito Santo – ES	Rio Doce	-	1?	-	qlnES1	X	X	X	X
	Gruta da Água Escondida – MG	S. Francisco	-	1♀	X	qlnMG1	X	X	X	X
	R. S. Francisco/Três Marias – MG	S. Francisco	-	2♀, 6♂, 1?	-	qlnMG2	X	X	X	X
	Rio Cipó/Santana do Riacho - MG	S. Francisco	S 19°20'13,44" W 43°39'20"	2?	-	qlnMG3	X	X	X	X
	Lagoa da Égua/Cocalinho - MT	Araguaia	S 13°20'3,06" W 50°42'9,72"	2?	-	qlnMT1	X	X	X	X
	Riacho Bairro Sta Cruz/Cuiabá - MT	Cuiabá	S 15°36'12,06" W 56°03'4,14"	3?	-	qlnMT2	X	X	X	X
	Rio Teles Pires/ Itaúba - MT	Tapajós	S 11°03'44" W 55°19'08"	1?	-	qlnMT3	X	X	X	X
Rio Matrinchã/ Itaúba - MT	Tapajós	S 10°51'09" W 55°13'44"	1?	-	qlnMT4	X	X	X	X	

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	Dados de GPS	Nº amostral	Citogenética	Código	DNA mitocondrial			
							Atpase 6 e 8	Cyt b	ND2	D-loop
<i>R. quelen</i>	Cachoeira da Neblina/ Peixoto de Azevedo - MT	Tapajós	S 10°23'10'' W 54°18'22''	1?	-	qlnMT5	X	X	X	X
	Lagoa Igarapé Carucarú/ Almeirim - PA	Amazonas	S 00°56'00'' W 52°32'18''	1?	-	qlnPA1	X	X	X	X
	Rio Curuá/ Altamira - PA	Xingu	S 08°46'09'' W 54°57'02''	2?	-	qlhPA2	X	X	X	X
	Rio Curuá/ Altamira - PA	Xingu	S 08°19'07'' W 55°05'23''	1?	-	qlnPA3	X	X	X	X
	Rio Jamanxim/ Novo Progresso - PA	Tapajós	S 07°43'51'' W 55°16'36''	1?	-	qlnPA4	X	X	X	X
	Caerana - PR	Iguaçu	S 25°26'45,8'' W 49°02'18''	1♂	-	qlnPR1	X	X	X	X
	Rio Iraí/Roseiras- PR	Iguaçu	S 25°29'35,7'' W 49°06'26''	2?	-	qlnPR2a,b	X	X	X	X
	R. do Oeste/ Cascavel - PR	Iguaçu	S 25°09'16,44'' W 53°19'40''	5♀, 9♂	X	qlnPR3	X	X	X	X
	C. Sangão/ Cascavel - PR	Iguaçu	S 25°08'6,24'' W 53°21'37,5''	6♀, 6♂	X	qlnPR4a,b	X	X	X	X
	RJ 155 - RJ (Angra)	Paraíba do Sul	S 22°53'11,4'' W 44°16'24,2''	2♀, 6♂	X	qlnRJ1	X	X	X	X
	Japuiba - RJ	Paraíba do Sul	S 22°33'55,5'' W 42°39'46,4''	3♂	-	qlnRJ2	X	X	X	X
	R. Paraíba do Sul - RJ	Paraíba do Sul	S 21°38'4,26'' W 42°02'1,92''	1♀	X	qlnRJ3	X	X	X	X
	Pirai/ Lídice - RJ - RJ	Paraíba do Sul	S 22°49'4,02'' W 44°11'15,5''	1♂	-	qlnRJ4	X	X	X	X
	R. São Jose - RJ	Paraíba do Sul	S 22°29'24'' W 43°36'20,7''	4♀	X	qlnRJ5	X	X	X	X
	Serra D'água - RJ	Paraíba do Sul	S 22°53'29,5'' W 44°16'46,5''	1♀, 3♂	-	qlnRJ6	X	X	X	X
	Silveira - RJ	Paraíba do Sul	S 22°40'33,2'' W 44°24'39''	1♀	-	qlnRJ7	X	X	X	X
	R. Uruguai/ Sta Maria - RS	Uruguai	-	3♀, 5♂	-	qlnRS1a,b	X	X	X	X
	Araras - SP	Mogi-Guaçu	S 22°22'59,6'' W 47°25'49,5''	3♀, 4♂, 1?	X	qlnSP1	X	X	X	X
	R. Capivara/Botucatu - SP	Tietê	S 22°52'12,5'' W 48°22'16,2''	1♂	X	qlnSP2	X	X	X	X
Colina - SP	Pardo	S 20°44'38,1'' W 48°34'20''	1♀	X	qlnSP3	X	X	X	-	

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	Dados de GPS	Nº amostral	Citogenética	Código	DNA mitocondrial			
							Atpase 6 e 8	Cyt b	ND2	D-loop
<i>R. quelen</i>	Córrego da Fortuna / Mariapolis - SP	Paraná	S 21°44'35,3'' W 51°18'28,9''	12♀, 4♂	X	qlnSP4a,b	X	X	X	X
	Córrego Passa Vinte/ Piquete - SP	Paraíba do Sul	S 22°32'52,4'' W 45°01'19,4''	1♀	X	qlnSP5	X	X	X	X
	Córrego Jacui/Cunha - SP	Paraíba do Sul	S 23°02'2,6'' W 44°56'6,2''	1♀, 2♂	-	qlnSP6	X	X	X	X
	Guapiara - SP	Paranapanema	S 24°11'30,18'' W 48°32'0,8''	9♀, 2♂	X	qlnSP7a,b	X	X	X	X
	R. dos Marins/ Piquete - SP	Paraíba do Sul	S22°34'48,6'' W 45°07'54''	1♀, 1♂	X	qlnSP5	X	X	X	X
	Rio Preto/ Sto Antonio do Pinhal - SP	Paraíba do Sul	S 22°49'58,9'' W 45°44'8''	5♂	X	qlnSP8a,b	X	X	X	X
	São Carlos - SP	Mogi-Guaçu	-	1♂	-	qlnSP9	X	X	X	X
	S. Miguel Arcanjo - SP	Paranapanema	S 23°54'44,58'' W 47°57'40,5''	1?	-	qlnSP10	X	X	X	X
	Rio Santana/Areias - SP	Paraíba do Sul	S 22°38'7,5'' W 44°36'33,8''	3?	-	qlnSP11	X	X	X	X
	Petar - SP	Ribeira do Iguape	-	1♂	X	qlnSP12	X	X	X	X
	Rio Passa Cinco/ Ipeuna - SP	Tietê	S 22°25'50,7'' W 47°41'47,1''	4♀, 1♂	X	qlnSP13	X	X	X	X
	Rio Ribeira de Iguape/ Registro - SP	Ribeira do Iguape	-	8?	-	qlnSP14	X	X	X	X
	Rio Pardo/ Caconde - SP	Pardo	-	1?	-	qlnSP15	X	X	X	X
	Pesqueiro Paraíso/Iguape - SP	Ribeira do Iguape	S 24°36'1,6'' W 47°52'32,6''	1♀	X	qlnSP16	X	X	X	X
Rio Sta Cruz/ Pozuzo/Pasco - PE	Pozuzo/Ucayali	S 10°02'12,2'' W 75°34'33,2''	1?	-	qlnPE2	X	X	X	X	

Número no GenBank		Perdices <i>et al.</i> , (2002)
<i>R. guatemalensis</i>	guaNI1 AY036651/ AY036778	
<i>R. laticauda</i>	latGU1 AY036708/AY036835	
<i>R. cinerascens</i>	cinEC1 AY036736/AY036863	
<i>R. quelen</i>	qlnVZ1 AY036737/ AY036864	
	qlnGY1 AY036739/ AY036836	
	qlnARG1 AY036743/ AY036870	
	qlnPE1 AY036740/ AY036867	

Legenda: ? = indivíduo cujo sexo não pode ser identificado, X = estudo realizado, - = ausência de dados.

2.2 Procedimentos metodológicos

2.2.1 Estudos citogenéticos

2.2.1.1 Preparação de cromossomos mitóticos (Gold *et al.*, 1990)

1. Sacrificar o animal, previamente anestesiado em uma solução de benzocaína, e coletar porções dos rins anterior e posterior com auxílio de pinças;
2. Transferir o material para uma cubeta de vidro contendo de 2 a 8 mL de meio Hank's;
3. Dissociar os tecidos com o auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, através de movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células;
4. Adicionar 3 a 4 gotas de colchicina 0,025%, ressuspendendo, cuidadosamente, o material com auxílio de uma pipeta Pasteur;
5. Incubar a suspensão em uma estufa a 37 °C por cerca de 15 minutos;
6. Transferir o material, com auxílio de uma pipeta de Pauster, para um tubo de centrífuga, ressuspendendo o material e centrifugá-lo por 10 minutos a 1000 rpm;
7. Retirar o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta de Pauster, tomando cuidado para não ressuspender o material. Acrescentar cerca de 8 mL solução de KCl 0,075M, ressuspender o material e deixá-lo em estufa a 37 °C por 25 minutos;
8. Adicionar 1mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético), ressuspender o material e centrifugá-lo por 10 minutos a 1000 rpm;
9. Retirar o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta de Pauster, tomando cuidado para não ressuspender o material. Acrescentar cerca de 8 ml solução de fixador e centrifugar por 10 minutos;
10. Repetir o passo 9 mais 2 vezes;

11. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação, adicionar cerca de 1,5 ml de fixador e ressuspender o material, transferindo-o para frascos plásticos do tipo eppendorf, os quais são armazenados em freezer a cerca de -4°C .

2.2.1.2 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs)(Howell e Black, 1980)

1. Pingar sobre uma lâmina previamente preparada, 2 gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção 1ml/100ml de solução) e 4 gotas de solução aquosa de nitrato de prata 50%;
2. Cobrir a lâmina com uma lamínula limpa;
3. Incubar em estufa a 60°C até que a lâmina adquira uma coloração caramelo;
4. Lavar a lâmina em água destilada, possibilitando que a lamínula seja naturalmente retirada pela própria água;
5. Corar com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 por cerca de 20 a 30 segundos;
6. Lavar em água corrente e secar ao ar.

2.2.1.3 Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972)

1. Tratar a lâmina com HCl 0,2N por cerca de 13 minutos em temperatura ambiente;
2. Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar;
3. Tratar a lâmina em solução aquosa de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5% a 42°C durante 45 segundos;
4. Lavar rapidamente a lâmina em HCl 0,2M;
5. Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos;
6. Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar e corar com Giemsa 5% durante 10 minutos.

2.2.1.4 Coloração por cromomicina A₃ (Schmid, 1980)

1. Inicialmente, colocar sobre uma lâmina previamente preparada, cerca de 150 µL de solução de Distamicina 0,3 mg/mL, cobrir com lamínula e deixar agir por cerca de 15 minutos em câmara escura;
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto;
3. Adicionar cerca de 150 µl de solução CMA₃ (0,5g/mL), cobrir novamente o material com lamínula e deixar agir em local protegido da luz por uma hora;
4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em um jato de água corrente por aproximadamente 1 minuto;
5. Montar a lâmina com uma nova lamínula utilizando meio de solução saturada de sacarose previamente filtrada;
6. Guardar a lâmina em local escuro por cerca de 15 a 30 dias para estabilização da fluorescência;
7. Analisar a lâmina em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 (zona de excitação do azul).

2.2.1.5 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

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

Marcação da Sonda de DNA com Biotina (Kit Bionick Labeling System – Invitrogen):

1. Pipetar em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL, no gelo (caso use termociclador, use tubo de 0,2 mL):
 - Adicionar 5 μ L de dNTP mix 10x.
 - Adicionar ___ μ L (1 μ g) de DNA.
 - Adicionar ___ μ L de água destilada (q.s.p. 45 μ L).
 - Adicionar 5 μ L de Enzima mix 10x.
2. Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g).
3. Incubar a 16°C por uma hora (para sondas pequenas, o tempo de incubação pode ser de até duas horas).
4. Adicionar 5 μ L de Stop Buffer;
5. Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (5 μ L) e etanol absoluto gelado (110 μ L). Misturar invertendo o tubo. Levar a freezer -20°C 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 μ L de água destilada;
9. Repetir os passos 5 e 6.
10. Ressuspender em 80 μ L de TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) – 1 mM EDTA) e armazenar a -20°C. 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 μ L de RNase 0,4% em 2xSSC, por uma hora, em câmara úmida a 37°C.

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 70°C.
2. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada.
3. Deixar secar ao ar, enquanto prepara-se 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 37°C 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 42°C, durante 5 minutos cada.
3. Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42°C durante 5 minutos cada.
4. Lavar uma vez em 2xSSC a 42°C 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 anti-avidina 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 (anti-avidina)
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. Montar as lâminas com solução de iodeto de propídio e antifade, na proporção de 200 μ L de antifade para 8 μ L de PI a 50 μ g/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.

2.2.1.6 Captura de Imagens

As preparações foram analisadas em microscópio ótico ou microscópio de epifluorescência e capturadas com 5Mp de definição através do sistema de análise de imagens CoolSnap Pro, utilizando-se para tal o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics)

2.2.2 Estudos Moleculares

2.2.2.1 Extração salina de DNA total (Aljanabi e Martinez, 1997)

1. Retirar uma amostra de tecido e colocar em eppendorf estéril. Deixar secar em estufa a 37°C até a evaporação do álcool (5 a 10 min);
2. Homogeneizar bem a amostra com auxílio de uma tesoura, ou pinça, em 400 μ L de tampão salino;

3. Adicionar 40µL de SDS 20% (concentração final 2%) e 8 µL de proteinase K (10mg/mL). Misturar bem;
4. Incubar por cerca de 1 hora a 65°C ou *overnight*;
5. Esperar a amostra atingir a temperatura ambiente e adicionar 10µL de RNase (10mg/mL) e deixar cerca de 1 hora a 37°C;
6. Adicionar 300µL 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 600µL de isopropanol gelado e misturar bem, vertendo o tubo delicadamente;
10. Incubar a -20°C por 1 hora ou *overnight*;
11. Centrifugar 20 minutos a 10.000G (4°C);
12. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet em 600µL de etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000G (4°C);
13. Secar o pellet em estufa até evaporação de álcool ou deixar a temperatura ambiente *overnight*;
14. Adicionar 50µL de TE ou água estéril. Deixar as amostras 24h a 4°C. Armazenar em freezer (-20°C).

2.2.2.2 Amplificação dos genes mitocondriais

Para a amplificação das regiões mitocondriais estudadas foram realizadas reações de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando os seguintes pares de primers:

- ATPase 6 e 8: ATP8.2-L8331 (5'-AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC-3') + CO3.2-H9236 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C-3') (Sivasundar *et al.*, 2001), que

amplificam um segmento de aproximadamente 900pb, 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 flangeadoras dos genes de tRNA da glutamina e treonina, amplificando cerca de 1000pb da sequência do gene do Citocromo b.
- ND2: Met-L4437 (5'-AAG CTT TCG GGC CAT ACC-3') + DN2-H4980 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C- 3') (Sivasundar *et al.*, 2001) que geram fragmentos de cerca de 550pb referentes às sequências parciais do RNA transportador da metionina e da subunidade 2 do gene da NADH-desidrogenase (ND2).
- D-loop: F-TTF (5'- GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA -3') + F-12R (5'GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG -3') (Sivansundar *et al.*, 2001) que hibridam nos genes para tRNA flangeadores da região D-loop, amplificando um fragmento de aproximadamente 1.100 pb.

Cada reação de PCR apresentou um volume final de 25 μ L, contendo:

- 1 μ L l de DNA molde [20ng/ μ L]
- 1 μ L de cada primer [10pM]
- 1,5 μ L de MgCl₂ [25mM]
- 2,5 μ L de tampão [10x]
- 2,5 μ L de dNTP [10 μ M]
- 0,25 μ L [5U]de Taq polimerase - Fermentas
- 15,25 μ L de água destilada)

As reações foram realizadas em termociclador PTC-110 Programmable Thermal Controller - MJ Research e as condições da PCR foram as seguintes: 94°C (4 min), cinco ciclos de: 92°C (30 seg), 53°C (30 seg), 72°C (90 seg), 40 ciclos de: 92°C (30 seg), 56°C (30 seg), 72°C (90 seg), seguidos por uma elongação final a 72°C (10min) e um período de resfriamento a 4°C. Para confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, estes foram aplicados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

2.2.2.3 Purificação do produto de PCR e Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ChargeSwitch PCR Cleanup da Invitrogen de acordo com as recomendações do fabricante. Depois de purificado, foi realizada uma corrida eletroforética com produto de PCR para visualização das bandas e quantificação do DNA. Essa corrida foi realizada como descrito anteriormente, porém em gel de agarose 2%.

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: 15ng de DNA (produto purificado); 2µL 1X Sequencing Buffer; 0,5µL de cada primer (mesma concentração utilizada para a realização da PCR original); 1µL BigDye® Terminator v3.1.

As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 30 segundos; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C. Depois de terminada a reação, os produtos foram precipitados utilizando-se o seguinte protocolo:

1. adicionar os 80 μL do mix (3 μL de acetato de sódio 3M; 62,5 μL de etanol 95%; 14,5 μL de água bidestilada) por tubo de reação;
2. Homogeneizar cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e deixar os tubos no escuro por no mínimo 15 minutos;
3. Centrifugar por 20 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
4. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta;
5. Adicionar 200 μL de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
6. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta e deixar os tubos durante 3 minutos a 95°C (com a tampa aberta) para evaporação do álcool;
7. Manter a -20°C até o momento da aplicação das amostras no sequenciador.

As amostras foram entregues a técnica especializada responsável pelo manuseio do sequenciador (modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI) no Instituto de Química-USP.

2.2.2.4 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 sequenciador).

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 DNAm_t, fez-se uso do programa Gene Runner v.3.05. As sequências foram então verificadas no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando para tanto o programa “BlastN”, averiguando assim, a similaridade destas com sequências de DNAm de outros peixes. Para verificação do alinhamento, foi visualizado o quadro de leitura das sequências através do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007), uma vez que a tradução dos códons das sequências codificadoras possibilita a detecção de erros.

Após a obtenção das sequências gênicas e sua concatenação, foi realizada a verificação da presença de diferentes haplótipos dentro das amostras. Cada haplótipo recebeu um código de identificação relacionado com o local de coleta e espécie (Tabela 3), e amostras de localidades muito próximas e que apresentaram o mesmo haplótipo, receberam o mesmo código identificador. Quando diferenças entre as sequências (incluindo diferenças de um par de base) eram observadas, atribuiu-se a estas um código de letras associado ao código identificador.

Todas as sequências foram então 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 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.

2.2.2.5 Análises filogenéticas

Para as análises evolutivas foram escolhidos quatro indivíduos dentro de cada amostra, geralmente dois machos e duas fêmeas, quando possível. Quando a amostra apresentava cromossomos supranumerários o número de indivíduos utilizados

aumentava para seis. Como grupos externos foram escolhidas as seguintes espécies pertencentes à família Heptapteridae: *Acentronichthys leptus*, *Imparfinis minutus* e *Pimelodella meeki*.

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 transversão, 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 através 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) através 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 frequência maior que 50%. Para todas as análises, valores de *bootstrap* entre 50-70 foram considerados fracos, entre 70-90 bons e iguais ou superiores a 90, fortes.



Capítulo 1

Capítulo 1

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE POPULAÇÕES DE *Rhamdia* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) COLETADAS EM CAVERNAS BRASILEIRAS.

Palavras-chave: cariótipo, cromossomos supranumerários, mosaico cromossômico, *Rhamdia*, troglóbio.

Resumo

O gênero *Rhamdia*, popularmente conhecido como jundiá, compõe um grupo de bagres de água doce frequentemente encontrado em rios e riachos ao longo de toda a extensão neotropical. Apesar do gênero ser composto, em sua maioria, por formas epígeas, esse é também considerado como o gênero de Siluriformes mais representativo em águas subterrâneas. No Brasil, a única espécie troglóbia de *Rhamdia* reconhecida é *R. enfurnada*, embora indivíduos de *R. quelen* também possam, eventualmente, ser encontrados nos corpos de água que cortam as cavernas desta região. No presente trabalho análises citogenéticas foram empregadas em amostras de *Rhamdia enfurnada* e *R. quelen* coletadas em cavernas brasileiras, com o objetivo de prover uma análise cromossômica comparativa entre populações troglóbias e troglógenas de *Rhamdia*. Todas as amostras apresentaram $2n = 58$ cromossomos com fórmulas cariotípicas distintas. Um cromossomo supranumerário metacêntrico pequeno e um caso de mosaicismo cromossômico foram identificados em *R. quelen*. O padrão de bandamento C, número e localização das RONS e sítios de DNAr 5S mostraram-se conservados. Dados da evolução cromossômica no grupo são discutidos.

Introdução

O gênero *Rhamdia*, popularmente conhecido como jundiá, é formado por peixes de hábito generalista que apresentam ampla distribuição na região Neotropical. Esses peixes são encontrados desde o Sul da Argentina até o extremo Sul do México, ocupando uma variedade de habitats, constituídos, em sua maioria, de pequenos córregos (de Pinna, 1998). Atualmente são reconhecidas 12 espécies válidas de *Rhamdia*, oito destas encontradas no Brasil (Bockmann, 2007). *Rhamdia* é um dos poucos gêneros dentro de Siluriformes que possui representantes que habitam regiões de caverna (Romero e Paulson, 2001).

Certas características presentes em alguns representantes de Siluriformes, como a atividade predominantemente crepuscular ou noturna, natação orientada por barbilhões e sentidos químicos e hábito alimentar oportunista, permitem que esses animais apresentem um grande potencial para a ocupação dos corpos d'água presentes nos ambientes cavernícolas (Trajano, 2000).

No Brasil são encontradas 24 espécies de peixes troglóbios, das quais, 22 espécies pertencem à ordem Siluriformes, fazendo parte de quatro famílias: Trichomycteridae (10), Heptapteridae (9), Loricariidae (2) e Callichthyidae (1) (Trajano, 2003). Dentre os heptapterídeos que apresentam traços troglomórficos encontram-se duas espécies do gênero *Pimelodella*, *P. kronei* (Trajano e Britski, 1992) e *P. spelea* (Trajano *et al.*, 2004), uma espécie de *Rhamdia* (*R. enfurnada*) (Bichuette e Trajano, 2005) e algumas espécies do Estado do Mato Grosso do Sul ainda não descritas (Mattox *et al.*, 2008).

Até 1996 eram conhecidas pelo menos oito espécies troglóbias (exclusivamente subterrâneas) no gênero *Rhamdia*, encontradas no México e na América Central. Essas espécies foram sinonimizadas por Silfvergrip (1996) em *R. laticauda* ou *R. quelen*, apesar

de apresentarem traços troglomórficos marcantes que permitiriam sua distinção. Após o estudo de Silfvergrip (1996), pelo menos mais três espécies troglóbias de *Rhamdia* foram descritas, de forma que este é passou a ser um dos gêneros de Siluriformes mais representativos em águas subterrâneas (Perdices *et al.*, 2002)

Rhamdia enfurnada, é a única espécie válida do gênero *Rhamdia* exclusivamente cavernícola encontrada no Brasil. Essa espécie é endêmica da Gruta do Enfurnado (Serra do Ramalho – BA) e apresenta uma ampla variabilidade intrapopulacional na pigmentação e no grau de desenvolvimento dos olhos, os quais são considerados bastante reduzidos quando comparados com as formas epígeas. Em comparação com outros peixes cavernícolas, como, por exemplo, *Rhamdiopsis*, considera-se que *R. enfurnada* apresenta um baixo grau de troglomorfose, e isso se deve, possivelmente, ao pequeno tempo de isolamento desta espécie no ambiente subterrâneo (Bichuette e Trajano, 2005).

Em cavernas brasileiras também são encontrados espécimes não-troglóbios de *Rhamdia*, ou seja, que apresentam padrão semelhante de pigmentação e olhos tão desenvolvidos quanto às formas epígeas. Essas ocorrências, que podem variar desde a presença de um indivíduo até a presença de pequenos grupos, são ocasionais, de forma que, aparentemente, estes animais procuram esses ambientes para se alimentar, mas não completam seu ciclo de vida dentro das cavernas, sendo então considerados organismos troglógenos (Bichuette e Trajano, 2005).

Análises citogenéticas comparativas vêm sendo aplicadas em peixes troglóbios e de superfície numa tentativa de identificar a possível espécie próxima que iniciou a colonização das cavernas dando origem aos peixes cavernícolas atuais. É o caso do lambari-cego *Astyanax mexicanus*, cujo padrão cariotípico, bem como o padrão de

distribuição de DNA repetitivo e de sítios de DNAr 5S mostrou-se mais relacionado com *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* do que com as demais espécies do gênero (Kavalco e Almada-Toledo, 2007). Estudos desta mesma natureza também apontaram uma forte relação evolutiva entre *Pimelodella kronei* e *P. transitoria*, que apresentaram, além de outros marcadores citogenéticos, a mesma fórmula cariotípica, demonstrando uma relação muito próxima entre as duas espécies, sugerindo que *P. transitoria* e *P. kronei* derivam de uma mesma espécie ancestral (Almeida-Toledo *et al.*, 1992).

Com o intuito de buscar informações que possibilitem traçar inferências sobre a evolução cromossômica do grupo, bem como tentar estabelecer uma possível relação entre os padrões cromossômicos encontrados entre espécies de *Rhamdia* coletadas em cavernas, no presente estudo foram realizadas análises citogenéticas comparativas entre amostras de *R. enfurnada* e amostras troglóxicas de *R. quelen*, pertencentes a uma mesma formação geográfica e banhadas pela mesma rede hidrográfica, para tal foram utilizadas tanto metodologias citogenéticas clássicas, como metodologias moleculares.

Materiais e Métodos

Foram estudados 24 exemplares (10♀, 6♂, 8 juvenis) de *R. enfurnada*, provenientes da Gruna do Enfurnado, município de Coribe – Bahia; cinco exemplares de *R. quelen* (5♀) coletados na Lapa do Peixe, município de Carinhanha – Bahia; e 1 exemplar de *R. quelen* (1♀) proveniente da Gruta da Água Escondida, município de Itacarambi – Minas Gerais. Todas as localidades estudadas são banhadas por rios pertencentes à bacia do Médio São Francisco.

Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim usando-se a 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). O número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico.

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) através 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 A₃ (CMA₃). Para evidenciar os blocos de heterocromatina constitutiva aplicou-se a técnica descrita por Sumner (1972), sendo o tempo de exposição aos reagentes adaptado ao material em estudo. A localização direta de cístrons ribossômicos foi realizada através 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).

Resultados

Todos os exemplares analisados apresentaram $2n = 58$ cromossomos, diferindo, entretanto, em sua composição cariotípica, sendo que *R. enfurnada* apresentou $34m + 16sm + 8st$ (NF = 116) (Figura 2.1A), *R. quelen* – Água Escondida, $36m + 18sm + 4st$ (NF = 116) (Figura 2.1B) e *R. quelen* – Lapa do Peixe, $32m + 14sm + 10st + 2a$ (NF = 114) (Figura 2.2A). Foi ainda observada a presença de um cromossomo supranumerário metacêntrico pequeno no espécime de *R. quelen* – Água Escondida, responsável por uma variação numérica interindividual nas metáfases analisadas. Ainda com relação à

constituição cromossômica, foi observado na população de *R. quelen* proveniente da Lapa do Peixe, um polimorfismo estrutural presente em algumas células de um dos indivíduos. Neste caso, de 50 células analisadas, 27 apresentaram constituição cariotípica normal e 23 células apresentaram um cromossomo subtelocêntrico médio no lugar de um dos homólogos do 28º par cromossômico, caracterizando a ocorrência de um mosaico cromossômico (Figura 2.2B).

O bandeamento C evidenciou para as três amostras analisadas pouca heterocromatina, representada por blocos pálidos localizados na região das RONS, sendo que alguns blocos banda C positivos (C+) pericentroméricos foram observados, sendo estes mais evidentes em *R. quelen* – Água Escondida, cujo cromossomo supranumerário mostrou-se eucromático (Figura 2.3A, C, E).

Em todas as amostras as RONS evidenciadas através da impregnação por nitrato de prata localizaram-se nos braços curtos dos cromossomos, sendo estas localizadas em um par de cromossomos submetacêntricos em *R. enfurnada* e em um par de cromossomos subtelocêntricos nas amostras de *R. quelen*. Estas regiões também se mostraram fluorescentes após a coloração por CMA₃ e a hibridação com sonda de DNAr 18S, confirmando a presença de um sistema de RONS simples. Nenhum sinal fluorescente adicional foi observado (Figura 2.1 e 2.2 boxes).

A técnica de FISH com sonda de DNAr 5S evidenciou a existência de dois sítios localizados na regiões pericentroméricas dos braços longos de um par de cromossomos metacêntricos médios. Esse padrão foi o mesmo para todas as amostras estudadas (Figura 2.3B, D, F).

Discussão

O gênero *Rhamdia*, juntamente com *Pimelodella*, estão entre os gêneros mais amplamente estudados do ponto de vista citogenético dentro de Heptapteridae (Swarça *et al.*, 2000). Com base nos trabalhos de Silfvergrip (1996) e Bockmann (2007), os dados citogenéticos existentes para algumas espécies de *Rhamdia* passam a ser sumarizados na espécie *R. quelen*, que devido à variação cariotípica observada, parece constituir um “complexo de espécies”, no qual podem ser verificados a manutenção do número diplóide em $2n = 58$ cromossomos, um alto grau de variabilidade da macroestrutura cromossômica e frequente presença de cromossomos supranumerários ou Bs (Garcia *et al.*, 2003). Para as outras espécies tidas como válidas, com exceção de *R. enfiada* analisada no presente trabalho, não há dados citogenéticos disponíveis.

A despeito da grande variabilidade cariotípica, que dificulta a proposta de inferências sobre a evolução cromossômica do grupo, algumas características microestruturais se mantêm conservadas, como, por exemplo, o número e localização das RONS nos cromossomos (Vissoto *et al.*, 1999; Fenocchio e Bertollo, 2000; Maistro *et al.*, 2002) e o número e localização dos sítios de DNAr 5s (Garcia *et al.*, 2003, presente trabalho).

Assim como as demais populações de *R. quelen*, as amostras estudadas no presente trabalho, provenientes da Lapa do Peixe e da Gruta da Água Escondida, possuem $2n = 58$ cromossomos, sendo que *R. quelen* - Gruta da Água Escondida ainda apresentou um cromossomo supranumerário metacêntrico pequeno similar ao observado em outras populações estudadas anteriormente (Fenocchio e Bertollo, 1990; Abucarma e Martins-Santos, 2001; Moraes *et al.*, 2007).

O cariótipo de *R. enfurnada*, apesar de possuir uma constituição macroestrutural diferente, mostrou-se similar aos observados em *R. quelen*, apresentando predominância de cromossomos dos tipos meta/submetacêntricos, sendo estes cromossomos de médio ou pequeno porte, o que indica que este, possivelmente, é um padrão compartilhado pelas espécies do gênero. Como foi observada a manutenção do número diplóide, a despeito dessas pequenas diferenças macrocariotípicas presentes nas populações e espécies de *Rhamdia* já estudadas citogeneticamente, é possível propor que rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos, com predomínio de inversões, sejam os principais mecanismos responsáveis pela grande variação na constituição cariotípica observada no gênero.

Inversões cromossômicas, pericêntricas e/ou paracêntricas, parecem ser o principal mecanismo de evolução cromossômica dentro de algumas famílias de Siluriformes, como Heptapteridae (Fenocchio *et al.*, 2003) e Pimelodidae (Garcia e Moreira Filho, 2008), sendo que em outros grupos, como Loricariidae, os rearranjos Robertsonianos parecem ser os rearranjos cromossômicos predominantes no processo de modificação da estrutura cariotípica (Artoni e Bertollo, 2001, Kavalco *et al.*, 2004a).

Relatos de polimorfismos estruturais e/ou numéricos são raros em Heptapteridae, mostrando-se associados a eventos de triploidia natural (Garcia *et al.*, 2003), polimorfismos de heterocromatina (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000) ou cromossomos supranumerários (Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Dias e Foresti, 1993; Vissoto *et al.*, 1999). Mosaicos cromossômicos são caracterizados pela presença de diferentes constituições cariotípicas entre as células de um mesmo indivíduo. A ocorrência de mosaicismos cromossômicos ainda não havia sido descrita dentro da família Heptapteridae, porém, já foi identificada em outros Siluriformes como *Hypostomus*

(Cerealli *et al.*, 2008) e *Trichomycterus* (Borin e Martins-Santos, 2000). A variação intra-individual observada em *R. quelen* proveniente da Lapa do Peixe envolve, aparentemente, a ausência de um dos homólogos do 28^o par cromossômico e sua substituição por um cromossomo subtelocêntrico de tamanho um pouco maior. Comparando o cariótipo normal e sua forma variante, observa-se que não há qualquer diferença de tamanho entre os pares cromossômicos presentes nos dois cariótipos, com exceção do cromossomo subtelocêntrico médio sem par presente no cariótipo variante, sendo que esta diferença de tamanho não foi associada a eventos de heterocromatinização (Figura 2.3). Como os demais cromossomos do complemento não apresentaram uma diferença de tamanho, a hipótese de ocorrência de uma translocação não-balanceada ou troca desigual entre os homólogos, foi descartada. Possivelmente, a diferença de tamanho responsável pelo mosaicismo deve-se a eventos de duplicação na região terminal de um dos homólogos do 28^o par. Essa hipótese, porém, só poderá ser confirmada com estudos mais aprofundados da estrutura cromossômica do par envolvido, como, por exemplo, com a microdissecção dos cromossomos e sua hibridação, uma vez que o bandeamento C não permitiu a identificação dos homólogos e tentativas de realização do bandeamento G neste material não foram bem sucedidas.

Apesar dos relatos da ocorrência de cromossomos supranumerários em Siluriformes aumentarem a cada dia, grande parte desses dados é referente a ocorrências ocasionais, como é o caso dos gêneros *Bergiaria* (Dias e Foresti, 1993), *Iheringichthys* (Vissoto *et al.*, 1999), *Pimelodella* (Almeida-Toledo *et al.*, 1992), *Pimelodus* (Borin e Martins-Santos, 2004), entre outros. Entretanto, estes cromossomos adicionais são uma característica marcante e bastante frequente de *R. quelen* (Hochberg e Erdtmann, 1988; Maistro *et al.*, 2002; Stivari e Martins Santos, 2004), embora nem

todas as populações analisadas os apresentem (Toledo e Ferrari, 1976; Swarça *et al.*, 2003).

Os cromossomos supranumerários em *Rhamdia* podem variar em tamanho (médios, pequenos e microcromossomos) e número (para revisão ver Garcia *et al.*, 2003), sendo que a maior variação numérica já relatada faz referência à presença de até sete desses cromossomos (Guilherme, 2005). O padrão de bandeamento C dos cromossomos supranumerários mostra-se variável, sendo que esses, em sua maioria, apresentam-se total ou parcialmente heterocromáticos (Hochberg e Erdtmann 1988; Fenocchio e Bertollo 1990, 2000; Vissoto *et al.*, 1999; Maistro *et al.* 2002) e em poucos casos, totalmente eucromáticos (Abucarma e Martin-Santos, 2001, presente trabalho).

A constante presença de cromossomos supranumerários nas populações já estudadas deste grupo indica que possivelmente a presença desses cromossomos em *R. quelen* seria anterior a possíveis eventos que tenham promovido o isolamento geográfico dessas populações, e que a diversificação desses cromossomos (numérica e estrutural) resultaria de eventos posteriores e independentes.

A despeito da frequente presença de cromossomos surpranumerários em *R. quelen*, *R. enfurnada* não apresentou tais elementos adicionais, de forma que apesar de esses cromossomos terem eventualmente uma origem comum para a espécie *R. quelen*, esta característica parece não ser compartilhada por todas as espécies do gênero. Neste sentido, reforça-se a necessidade de dar início aos estudos citogenéticos nas demais espécies do gênero, bem como a necessidade do aprofundamento dos estudos genéticos, com uma abordagem molecular, a fim de melhor estabelecer a relação evolutiva entre as populações e espécie de *Rhamdia* que apresentem ou não cromossomos supranumerários.

Com relação à presença de blocos de heterocromatina, dentre os Siluriformes podemos evidenciar a existência de diferentes padrões quando levamos em conta a quantidade, tamanho e distribuição desses. Grupos como os heptapterídeos, pimelodídeos e alguns loricariídeos, entre outros, possuem pouca quantidade de heterocromatina, que se apresenta na forma de pequenos e pálidos blocos, distribuídos, preferencialmente, nas regiões pericentroméricas e terminais dos cromossomos, sendo que as RONS, na grande maioria dos casos, também se apresenta associada à heterocromatina (Artoni e Bertollo, 2001; Fenocchio *et al.*, 2003; Swarça *et al.*, 2003; Kavalco *et al.*, 2004b). Outros grupos, como Hypostominae e Pseudopimelodidae, entre outros, apresentam uma maior quantidade de heterocromatina, presente em grandes blocos fortemente corados e de distribuição preferencialmente terminal, e que, em alguns casos, podem ocupar um braço cromossômico inteiro. Nesse grupo, as RONS também se mostram, em sua maioria, associadas a blocos de heterocromatina (Artoni e Bertollo, 2001; Kavalco *et al.*, 2004b; Marques *et al.*, 2008).

O padrão de distribuição da heterocromatina observado no presente trabalho mostra-se concordante com o padrão geral considerado para o gênero e para a família Heptapteridae, sendo que a pouca quantidade de heterocromatina e a palidez das bandas dificulta a perfeita diferenciação das espécies analisadas apenas com base no padrão de bandeamento C.

Os dados disponíveis indicam o predomínio de RONS simples, localizadas nos braços curtos de cromossomos submeta/subtelocêntricos em *R. quelen* (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio e Bertollo, 1990; Maistro *et al.*, 2002). Casos de RONS múltiplas, embora raros, também já foram descritos (Abucarma e Martins-Santos, 2001), sendo que estas, embora apresentem maior número de sítios, mantêm o mesmo padrão

de distribuição observado nas populações que apresentam RONS simples. O número e a localização das RONS também tem sido confirmados pela coloração por CMA3 e localização de genes ribossomais 18S (Garcia *et al.*, 2003; Swarça *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2007)

O uso de fluorocromos GC-específicos e da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S vem cada vez mais sendo utilizados em peixes como uma forma de identificar as RONS (Mayr *et al.*, 1985), mostrando-se mais eficientes pois não possuem a limitação da técnica de impregnação por nitrato de prata, capaz de evidenciar apenas as regiões ativas na intérfase precedente. Entretanto, o uso dos fluorocromos base-específicos pode resultar não apenas na identificação das RONS, mas também ressaltar regiões heterocromáticas ricas em conteúdo de bases CG (Borin e Martins-Santos, 2002; Garcia e Moreira-Filho, 2005), de forma que inferências sobre o número real das RONS é fidedigno apenas quando se leva em consideração a localização gênica através da FISH.

A distribuição do gene ribossômico 5S seguiu um padrão já observado em estudos anteriores realizados por Garcia *et al.* (2003), apresentando um par de sítios localizados pericentricamente no braço longo de um par de metacêntricos. Aparentemente, esses cromossomos são compartilhados entre as espécies já analisadas de *Rhamdia*, mostrando um estreito relacionamento evolutivo entre elas.

Das oito espécies descritas para o gênero *Rhamdia*, apenas duas foram analisadas do ponto de vista citogenético, o que ressalta a necessidade de estudos adicionais desta natureza dentro do grupo, uma vez que este apresenta grande variação de caracteres cromossômicos macroestruturais, em detrimento do conservadorismo dos caracteres microestruturais. Muito da diversidade cariotípica no grupo, como por exemplo, a presença e variação dos cromossomos supranumerários, podem estar subestimadas.

Apenas com a expansão dos estudos desta natureza é que inferências sobre a evolução cariotípica do grupo poderão ser realizadas com maior embasamento, permitindo o levantamento das tendências de modificação na estrutura cromossômica, possível caracterização de formas híbridas e a identificação de “complexos de espécie”.

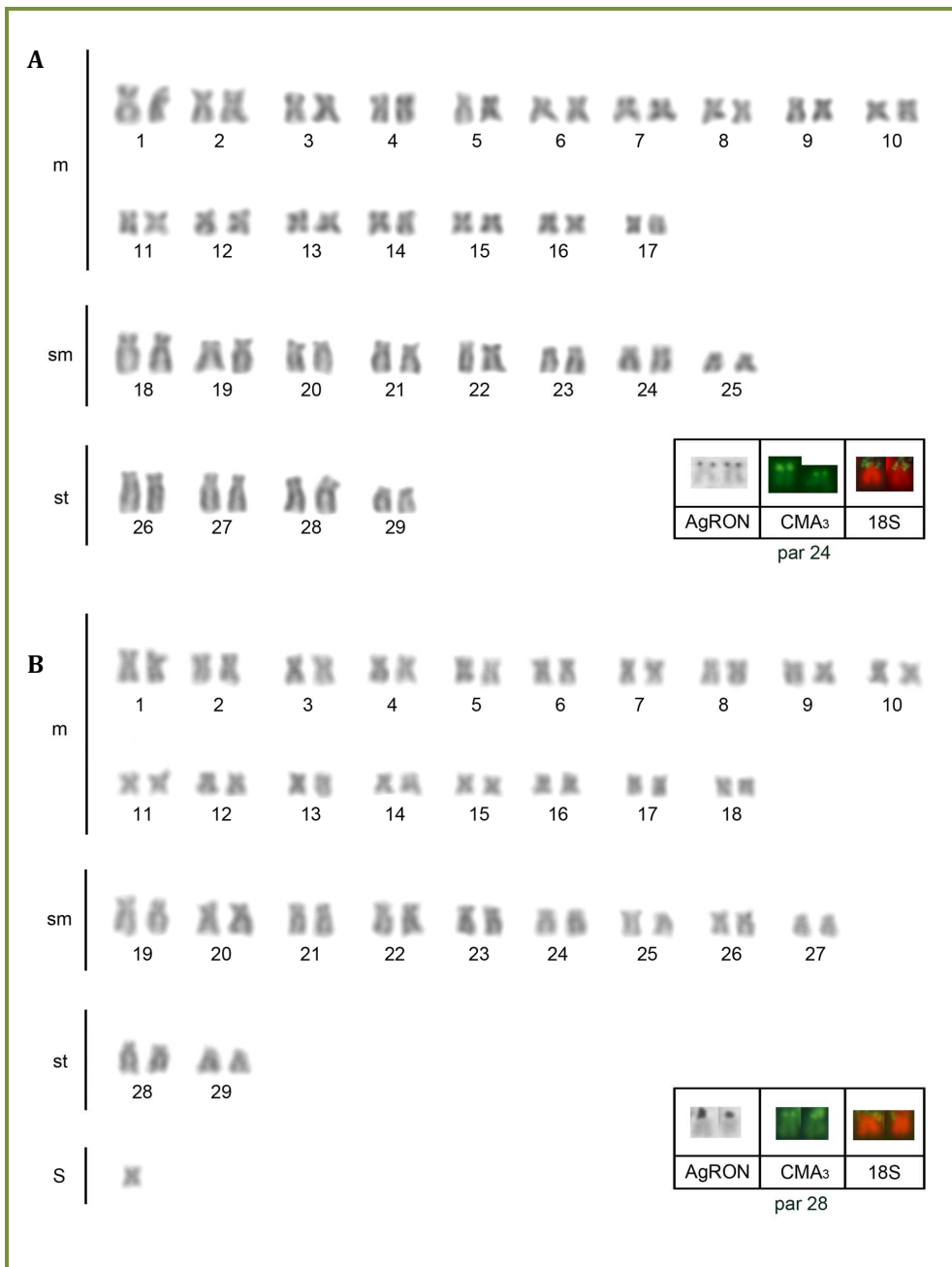


Figura 2.1: Cariótipos de **A:** *R. enfiunada* e **B:** *R. quelen* – Água Escondida, corados com Giemsa. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

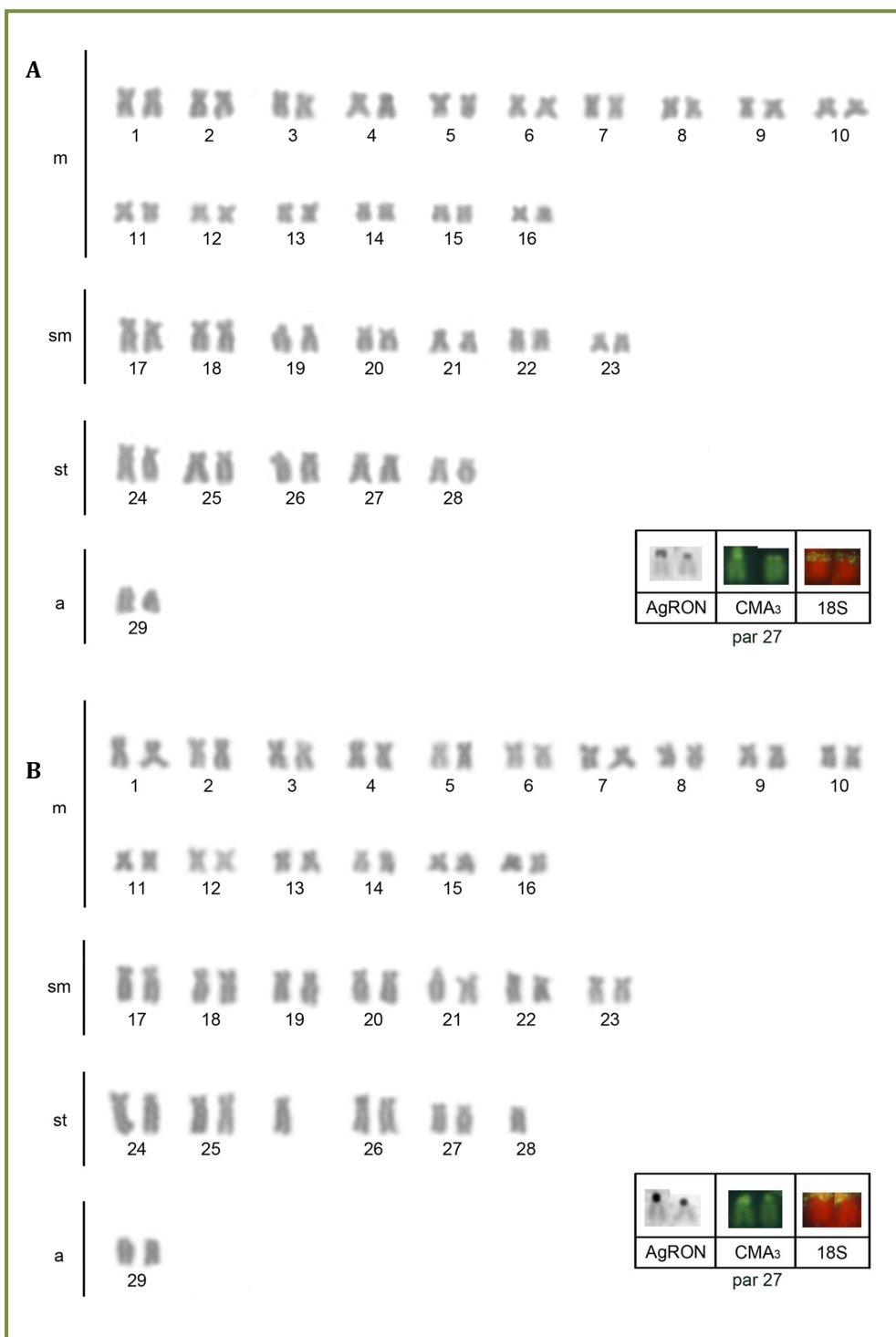


Figura 2.2: Cariótipos de *R. quelen* – Lapa do Peixe, corados com Giemsa. Em **A**: cariótipo padrão e em **B**: cariótipo variante (mosaico cromossômico). Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

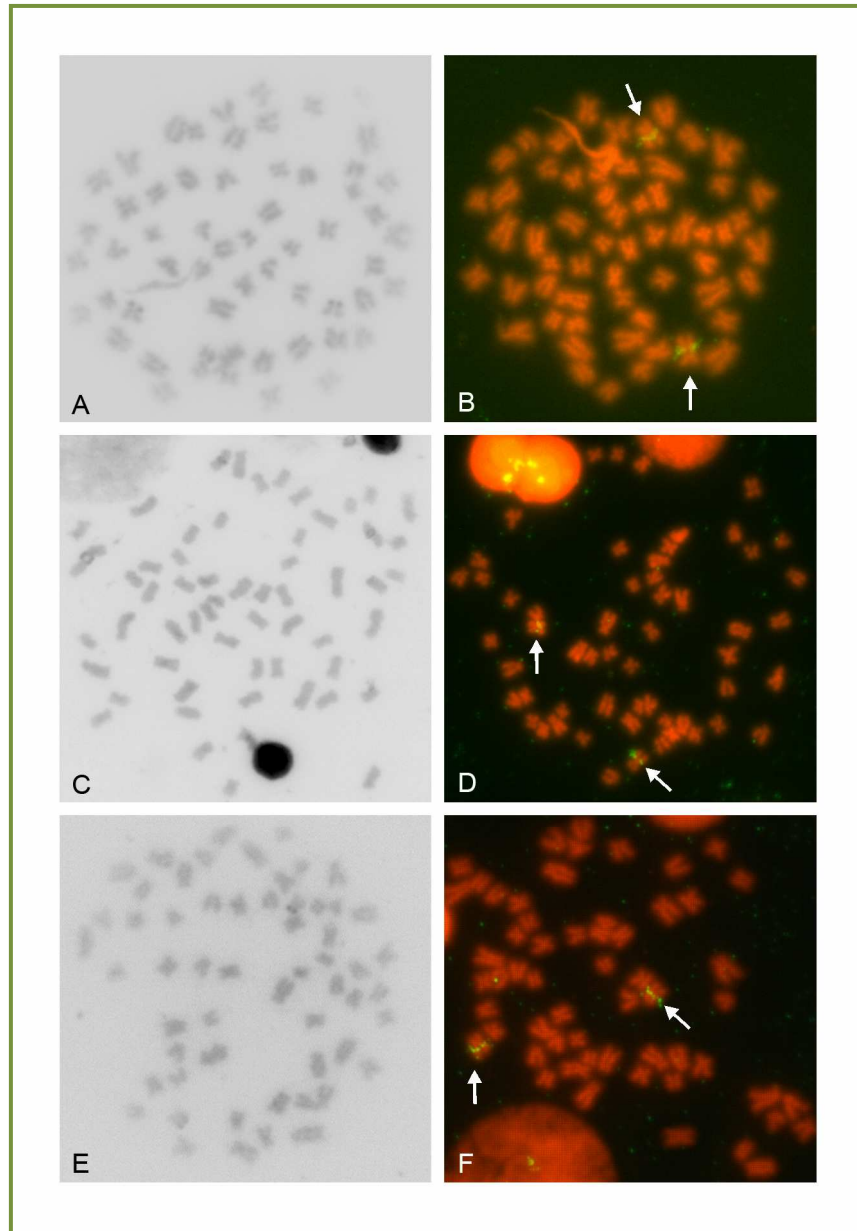


Figura 2.3: Metáfases somáticas de *R. enfulnada* (A, B), *R. quelen* – Água Escondida (C, D) e *R. quelen* – Lapa do Peixe (E, F) após bandamento C (A, C, E) e FISH com sonda de DNAr 5S (B, D, F). As setas indicam os sítios de DNAr.



Capítulo 2

Capítulo 2

TENDÊNCIAS DE EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) E OBSERVAÇÕES SOBRE A POSSÍVEL ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DE SEUS CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS.

Palavras-chave: cariótipo, cromossomos supranumerários, heterocromatina, não-disjunção, *Rhamdia*.

Resumo

Dentre as espécies do gênero *Rhamdia* descritas para o território brasileiro, *R. quelen* é a que apresenta maior distribuição, podendo ser encontrada em, praticamente, todas as bacias hidrográficas do país. Atualmente, *R. quelen* é sinonímia para, pelo menos, outras 47 espécies do gênero, sendo que seu estatus taxonômico permanece sobre discussão. Os dados citogenéticos disponíveis demonstram uma grande variabilidade na composição macroestrutural dos cariótipos marcada pela frequente presença de cromossomos supranumerários. A grande variabilidade citogenética associada aos conflitos taxonômicos que envolvem a espécie, são fortes indicadores de que *R. quelen* constitui, na verdade, um “complexo de espécies”. Com o intuito de realizar o maior estudo citogenético comparativo em *R. quelen* do Sul e Sudeste do Brasil e averiguar a possível ocorrência de um complexo de espécie, 14 populações provenientes das principais bacias hidrográficas destas regiões foram analisadas do ponto de vista cromossômico. Através da aplicação de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares

foram encontradas sete diferentes fórmulas cariotípicas, todas com $2n = 58$ cromossomos. A presença de cromossomos supranumerários foi observada para a maioria das populações estudadas, e seu número, tamanho e padrão de bandamento C permitiram a diferenciação de populações que apresentaram uma mesma constituição cariotípica. Padrões de evolução cromossômica na espécie, bem com os mecanismos envolvidos na possível origem e diferenciação morfológica de seus cromossomos supranumerários são discutidas.

Introdução

A ictiofauna neotropical é extremamente rica e diversa, contando com 50% das espécies de peixes de água doce mundial. Segundo Reis *et al.* (2003) existem cerca de 6000 espécies de peixes descritas para o neotrópico, distribuídas em 71 famílias e 25 ordens.

Heptapteridae é uma família de peixes estritamente neotropical, sendo composta por bagres de pequeno ou médio porte. Alguns de seus representantes apresentam a maior distribuição dentro desta região, sendo encontrados do extremo sul do México até o sul da Argentina (de Pinna, 1998), como, por exemplo, a espécie *Rhamdia quelen* (Silfvergrip, 1996).

R. quelen é uma das 12 espécies válidas do gênero *Rhamdia* (Bockmann, 2007), sendo atualmente sinonímia para outras 47 espécies anteriormente descritas para a América Central e América do Sul, como, por exemplo, *R. voulezi*, *R. branneri*, *R. hilari*, *R. sapo*, entre outras (Silfvergrip, 1996). Por ser a espécie que apresenta a maior distribuição dentro do gênero, *R. quelen* é também a espécie mais estudada dentro do grupo, tanto do ponto de vista morfológico, quanto citogenético.

Estudos morfológicos realizados por Silfvergrip (1996), na última revisão taxonômica do gênero *Rhamdia*, demonstraram que exemplares de *R. quelen* apresentam uma série de diferenças morfológicas quando são comparadas amostras de regiões geográficas distantes. Entretanto, o autor ressalta que estas diferenças seriam resultado de problemas de amostragem, de forma que, quando as falhas na cobertura da área de ocorrência desta espécie fossem sanadas, as diferenças morfológicas entre elas seriam insuficientes para sua distinção. Desta forma, o autor propõe que *R. quelen* seja a única espécie de *Rhamdia* cuja distribuição se daria ao longo de toda a extensão neotropical, sendo que esta pode, inclusive, ser encontrada vivendo em simpatria com outras espécies do gênero.

Do ponto de vista citogenético, cerca de seis espécies de *Rhamdia* haviam sido caracterizadas cromossomicamente (Tabela 1 – Introdução Geral), entretanto, após a adoção da proposta taxonômica de Silfvergrip (1996), estas espécies passaram a ser sumarizadas em *R. quelen*, de forma que esta seria a única espécie válida do gênero *Rhamdia* para a qual haveria dados citogenéticos disponíveis. Os dados cromossômicos demonstram uma grande variabilidade na composição macroestrutural dos cariótipos, representada por pequenas diferenças nas fórmulas cariotípicas das populações analisadas (Swarça *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2003), o que, para alguns autores, reforçaria a proposta da existência de um complexo de espécies em *R. quelen*.

Uma característica citogenética interessante observada em *R. quelen* é a frequente presença de cromossomos supranumerários, ou Bs, sendo estes cromossomos responsáveis por uma variação numérica intra e interindividual no número cromossômico total das populações analisadas (Tabela 2 – Introdução Geral). Em peixes, os cromossomos supranumerários são considerados um dos grandes dilemas da

citogenética, uma vez que sua função e origem permanecem desconhecidas, e estes, aparentemente, compõem elementos genéticos dispensáveis, que não apresentam efeitos fenotípicos visíveis em seus portadores e seriam neutros perante a seleção natural (Carvalho *et al.*, 2008).

A ocorrência de cromossomos supranumerários é relativamente frequente em peixes, sendo que relatos sobre sua ocorrência aumentam conforme novos grupos ou populações são estudados. O maior número de ocorrências destes cromossomos é descrito para a ordem Characiformes, seguida pela ordem Siluriformes e, em menor escala, por outros grupos de peixes (Carvalho *et al.*, 2008).

Dentro da ordem Siluriformes, os cromossomos supranumerários já foram descritos para representantes das famílias Callichthyidae (Oliveira *et al.*, 1988), Heptapteridae (Almeida-Toledo *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 2003; Almeida-Toledo e Garcia, 2008), Loricariidae (Andreatta *et al.*, 1993), Pimelodidae (Dias e Foresti, 1993; Borin e Martins-Santos, 2004; Carvalho *et al.*, 2004) e Trichomycteridae (Borin e Martins-Santos, 1997).

Os cromossomos supranumerários presentes em algumas populações de *R. quelen* são variáveis em tamanho, forma e padrão de bandamento C, sendo constituídos, em sua maioria, de cromossomos metacêntricos médios (Tabela 1 – Introdução Geral), que podem mostrar-se total (Hochberg e Erdtmann, 1988; Vissoto *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2003) ou parcialmente heterocromáticos (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000; Maistro *et al.*, 2002), ou ainda totalmente eucromáticos (Abucarma e Martins-Santos, 2001; Moraes *et al.*, 2007). Diferentemente de outras espécies de Siluriformes, nas quais a presença de cromossomos supranumerários é tida como um evento

ocasional, a presença destes cromossomos em *R. quelen* é frequente, podendo ser considerada como uma característica citogenética da espécie.

O presente estudo, seguindo a proposta de Silfvergrip (1996), buscou realizar a maior análise citogenética simultânea de diferentes populações de *R. quelen*, provenientes de algumas das principais bacias hidrográficas do sul e sudeste brasileiro, de forma a tentar estabelecer as tendências de evolução cariotípica dentro da espécie, bem como melhor caracterizar os cromossomos supranumerários que possam estar presentes nestas populações, realizando inferências sobre sua possível origem e evolução.

Material e Métodos

Foram analisados indivíduos de 14 populações de *R. quelen* provenientes das principais bacias hidrográficas dos Estados brasileiros do Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Tabela 4).

A preparação de cromossomos mitóticos foi obtida através da técnica adaptada por Gold *et al.* (1990), a partir de células do rim dos animais, utilizando o meio nutritivo Hank's para um melhor controle do tempo de ação da colchicina *in vitro*. A morfologia dos cromossomos foi determinada segundo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964) e o número fundamental (NF) foi calculado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços, e cromossomos acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico.

A caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) através da impregnação por nitrato de prata seguiu a técnica descrita por Howell e Black (1980),

enquanto que a coloração cromossômica por fluorocromos GC-específicos, foi efetuada utilizando-se o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA₃), segundo o protocolo de Schmid (1980) com algumas modificações.

Para a identificação dos blocos de heterocromatina constitutiva aplicou-se a técnica descrita por Sumner (1972), onde o tempo de exposição do material utilizado ao hidróxido de bário foi adaptado para cada população, variando entre 45 segundos e um minuto (para temperatura de 42°C).

Para a identificação do número e da localização dos genes ribossomais foi empregada à técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) seguindo o protocolo proposto por Pinkel *et al.* (1986) utilizando sondas de DNAr 18S (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de DNAr 5S (Martins e Galetti Jr., 1999).

Resultados

No presente estudo foram analisadas, em média, 50 metáfases por indivíduo. A contagem cromossômica permitiu estipular o número diplóide em $2n = 58$ cromossomos para todas as populações, sendo que, em alguns casos, foi observada uma variação no número de cromossomos, a qual foi atribuída à presença de cromossomos supranumerários. Todos os indivíduos das populações portadoras de cromossomos supranumerários apresentaram estes cromossomos adicionais, os quais foram responsáveis por uma variação intra e interindividual do número cromossômico (Fig. 3.1-3.7). Com relação à constituição cariotípica, foram identificadas seis diferentes fórmulas cromossômicas, onde algumas populações, apesar de compartilharem o mesmo padrão cariotípico, diferiram quanto a presença, tipo e/ou número de cromossomos supranumerários (Tabela 4).

Com relação às RONS, tanto a coloração por fluorocromos GC específicos, como a impregnação por nitrato de prata e a técnica de FISH com sonda de DNAr 18S, confirmaram um sistema de RONS simples para *R. quelen*. As RONS localizaram-se nos braços curtos de um par de cromossomos submeta ou subtlocêntricos dependendo da população estudada. Aparentemente, o par cromossômico portador destas regiões foi o mesmo para populações que apresentaram uma mesma fórmula cariotípica (Fig. 3.1-3.7 boxes).

O número e a localização dos genes ribossomais 5S, mostraram-se conservados nas populações analisadas, de forma que foi possível identificar sinais fluorescentes localizados pericentricamente nos braços longos de um par de cromossomos metacêntricos. A população de Mariápolis foi a única a apresentar um par de sítios de DNAr 5S adicional, representado por uma pequena marcação pericentromérica nos braços curtos de um par de cromossomos subtlocêntricos grandes (Fig. 3.8).

Tabela 4: Dados cromossômicos das populações de *R. quelen* analisadas no presente estudo.

Localidade (município ou rio/ Estado)	Nº de indivíduos	2N	Fórmula cariotípica	NF	Nº / tamanho dos supranumerários	Padrão de BC dos supranumerários
Cascavel/PR - rio do Oeste (BP)	5♀, 9♂	58	36m + 10sm + 12st	116	0	-
Cascavel/PR - c. Sangão (BP)	6♀, 6♂	58	32m + 8sm + 12st + 6a	110	0-1 médio	2
Angra dos Reis/RJ (PS)	2♀, 6♂	58	40m + 10sm + 8st	116	0	-
Rio S. José /RJ (PS)	4♀	58	36m+14sm+8st	116	0-1 médio	1
Rio Paraíba do Sul/RJ (PS)	1♀	58	36m+14sm+8st	116	0-1 médio	1
Araras/SP (AP)	3♀, 4♂, 1?	58	40m + 10sm + 8st	116	0-5 médios	1
Botucatu/SP - rio Capivara (AP)	1♂	58	44m + 12sm + 2st	116	0-1 médio	2
Colina/SP (AP)	1♀	58	36m + 10sm + 12st	116	0-5 pequenos	1
Guapiara/SP (AP)	9♀, 2♂	58	36m + 10sm + 12st	116	0	-
Iguape/SP (RI)	1♀	58	36m + 10sm + 12st	116	0	-
Ipeuna/SP - rio Passa Cinco (AP)	4♀, 1♂	58	34m + 16sm + 8st	116	0-2 médios	1
Mariápolis/SP - c. Fortuna (AP)	12♀, 4♂	58	40m + 10sm + 8st	116	0-1 médio	1
Piquete/SP (PS)	2♀, 1♂	58	40m + 10sm + 8st	116	0-2 pequenos	3
Sto. Antônio do Pinhal/SP (PS)	5♂	58	30m + 14sm + 12st + 2a	114	0-1 pequeno	3

Legenda: AP = bacia do alto rio Paraná; BP = bacia do baixo rio Paraná; PS = bacia do rio Paraíba do Sul; RI = Ribeira do Iguape. BC = Bandamento C; (1) cromossomos parcialmente heterocromáticos – apresentam apenas as regiões terminais de ambos os braços cromossômicos heterocromáticas; (2) totalmente eucromáticos; (3) totalmente heterocromáticos. Obs: As marcações de GPS e maiores descrições sobre as bacias hidrográficas encontram-se disponíveis na Tabela 3 (Materiais e métodos).

Com relação ao estudo dos blocos de heterocromatina constitutiva, através bandamento C foi possível observar uma pequena quantidade de heterocromatina representada por blocos pálidos distribuídos preferencialmente na região das RONS e nas regiões proximais dos centrômeros, sendo que blocos terminais e intersticiais puderam ser observados em alguns cromossomos. Não foi possível a identificação dentro do complemento cromossômico padrão de blocos banda C+ que pudessem ser utilizados como marcadores citogenéticos, de forma que o bandamento C não seria resolutivo para a diferenciação das populações analisadas se apenas os cromossomos do complemento A fossem utilizados nas análises (Fig. 3.9).

Os cromossomos supranumerários identificados no presente trabalho, apresentaram uma variação numérica intra e interindividual dentro das populações de *R. quelen* que os possuem, sendo que o maior número destes cromossomos (cinco) foi descrito para as populações provenientes das bacias do Pardo e Mogi-Guaçu. Em todas as populações os cromossomos adicionais foram do tipo metacêntrico e variaram em tamanho, sendo, em sua maioria, cromossomos médios e, em alguns casos, cromossomos pequenos (Tabela 4). Em ambas as situações, alguns dos cromossomos supranumerários só puderam ser corretamente identificados após o bandamento C, uma vez que esses apresentaram tamanho e forma similares aos cromossomos do complemento padrão.

Três tipos de padrão de bandamento C foram observados para os cromossomos supranumerários: (1) cromossomos parcialmente heterocromáticos – apresentam apenas as regiões terminais de ambos os braços cromossômicos heterocromáticas. Este padrão foi observado para todos os cromossomos supranumerários médios e alguns cromossomos pequenos; (2) totalmente eucromáticos – observado apenas para

cromossomos supranumerários pequenos; e (3) totalmente heterocromáticos – observado apenas para cromossomos pequenos (Fig. 3.9 e 3.10).

Discussão

Entre os Siluriformes observa-se um número cromossômico modal de $2n = 56$, o qual, segundo Oliveira e Gosztonyi (2000), seria o provável número diplóide ancestral para o grupo. Variações em torno deste número diplóide são frequentemente associadas a processos de especiação, e poderiam ser resultado tanto da ocorrência de rearranjos cromossômicos, como de possíveis eventos de poliploidia (Oliveira *et al.*, 1988).

Em Heptapteridae observa-se uma variação no número cromossômico que vai de $2n = 42$ até $2n = 58$ (Oliveira, 2003). Enquanto algumas espécies dessa família, como representantes dos gêneros *Pimelodella* e *Imparfinis*, apresentam grande variabilidade em termos de número diplóide, *R. quelen* apresenta uma manutenção deste em $2n = 58$ cromossomos para todas as populações já analisadas. Levando-se em consideração que *R. quelen* é a espécie melhor estudada citogeneticamente dentre os heptapterídeos, a manutenção do número diplóide pode ser considerada uma característica desta espécie.

A despeito da manutenção do número diplóide, *R. quelen* é marcada por uma acentuada variabilidade na constituição cromossômica, onde cromossomos de dois braços predominam na composição do cariótipo. Situação semelhante pode ser observada em outros grupos de Siluriformes, como Auchenipteridae, Doradidae, Pimelodidae e Pseudopimelodidae (Garcia, 2005), bem como alguns grupos de Characiformes, como Anostomidae, Chilodontidae, Paradontidae e Prochilodontidae (Martins *et al.*, 2000). Variações envolvendo a fórmula cariotípica associadas à manutenção do número diplóide indicam que rearranjos cromossômicos não-

Robertsonianos seriam os principais mecanismos que estariam atuando na evolução dos cromossomos. Inversões cromossômicas (peri e paracêntricas) vêm sendo consideradas como um dos principais agentes de modificação cariotípica dentre alguns grupos de Siluriformes (Dias e Foresti, 1993; Garcia e Moreira-Filho, 2008).

No presente trabalho foram encontradas diferentes fórmulas cariotípicas para as populações de *R. quelen* (Tabela 4). Duas destas foram observadas na parte baixa da bacia do rio Paraná (32m+8sm+12st+6a e 36m+10sm+12st), três na parte alta da bacia do Rio Paraná (34m+16sm+8st, 36m+10sm+12st e 40m+10sm+8st) e três na bacia do Paraíba do Sul (30m+14sm+12st+2a, 36m+14sm+8st e 40m+10sm+8st). A fórmula cariotípica 36m+10sm+12st foi a mais frequente dentro da bacia do rio Paraná, enquanto que a composição 40m+10sm+8st foi a mais frequente para a bacia do rio Paraíba do Sul.

A partir destes dados, somados aos dados citogenéticos da Tabela 1 (Introdução Geral), também foi possível observar que cariótipos compostos por um menor número de cromossomos metacêntricos (36 ou menos) contam com a presença de cromossomos acrocêntricos em sua composição. Quando comparado o tamanho dos cromossomos que compõem os distintos cariótipos obtidos neste estudo, observar-se que esses mantêm, basicamente, as mesmas proporções. Este fato pode ser considerado um forte indício de que as modificações na macroestrutura cromossômica, seriam, provavelmente, resultado de inversões cromossômicas, que poderiam ser consideradas o principal mecanismo de modificação cariotípica em *R. quelen*.

Até o presente momento, não foi possível estabelecer um padrão cariotípico que caracterizasse as formas de *R. quelen* presentes em uma determinada localidade ou rede hidrográfica. Observa-se também, que populações que compartilham o mesmo padrão

cariotípico dos cromossomos do complemento A, diferem quanto ao tipo, número, tamanho e padrão de bandamento C dos cromossomos supranumerários. Com base em dados de sequenciamento de genes mitocondriais, o gênero *Rhamdia* apresenta uma divergência bastante recente (Perdices *et al.*, 2002), o que poderia indicar que estes animais estariam passando por um processo inicial de diferenciação cariotípica que poderia reforçar seu isolamento reprodutivo, levando à especiação. Estes peixes tendem a formar pequenas populações presentes em pequenos cursos d'água, que podem ser expostas a condições diferenciadas e que resultariam em um processo de especiação por alopatria, o que explicaria a grande variabilidade na estrutura cariotípica e no padrão dos cromossomos supranumerários destes animais.

O fato de uma mesma fórmula cariotípica ser encontrada em diferentes localidades poderia ser explicado como resultado de convergência adaptativa ou pela manutenção de um cariótipo ancestral. A hipótese de manutenção de um cariótipo ancestral baseia-se no fato de que as bacias estudadas no presente trabalho, no caso o baixo e alto rio Paraná, possuem uma conexão física. A possibilidade de eventos de captura de cabeceira pelos rios da bacia do Paraná pelos rios da bacia do rio Paraíba do Sul (e vice-versa), bem como a ação humana, que poderia resultar na introdução de formas não nativas aos estoques naturais, também devem ser consideradas.

Nos eucariotos, encontram-se quatro tipos de RNAr (RNA ribossômico), os quais diferem tanto em sua composição, quanto em seu coeficiente de sedimentação. Todos estes RNAr são codificados por múltiplas cópias de genes. Os DNAr 18S, 5.8S e 28S, fazem parte de uma mesma unidade de transcrição (DNAr 45S). Estas unidades encontram-se organizadas em tandem (em ordem dentro de uma seqüência gênica repetitiva), separadas por seqüências internas de genes, os espaçadores transcritos

internos, e encontram-se localizadas nas regiões das RONS. Já o DNAr 5S é transcrito independentemente, localizando-se separadamente daqueles responsáveis pelos outros três tipos de RNAr. Este gene, também apresenta múltiplas cópias arranjadas em tandem e separadas por espaçadores transcritos, localizando-se, na grande maioria dos eucariontes, em regiões cromossômicas diferentes da região das RONS (Martins e Wasko, 2004).

Atualmente, para a identificação das RONS em vertebrados inferiores, utilizam-se diferentes metodologias, tais como a impregnação por nitrato de prata, coloração por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* com sondas específicas. O estudo destas regiões em peixes têm ajudado na caracterização cariotípica de diversas espécies, casos de RONS polimórficas, no que diz respeito à localização (Feldberg *et al.*, 1992) e tamanho (Foresti *et al.*, 1981; Galetti Jr. *et al.*, 1984; Moreira Filho *et al.*, 1984), tem sido freqüentemente relatadas. A ocorrência de polimorfismos interindividuais também foi observada em *Apareiodon affinis* (Jesus *et al.*, 1999) e *Serrasalmus* (Cestari e Galetti Jr., 1992). Casos de RONS localizadas em cromossomos sexuais (Reed *et al.*, 1997; Born e Bertollo, 2000; Artoni e Bertollo, 2002) e supranumerários (Dantas *et al.*, 2007; Almeida-Toledo e Garcia, 2008) também já foram descritos.

Os dados disponíveis indicam o predomínio de RONS simples, localizadas nos braços curtos de cromossomos submeta/subtelocêntricos em *R. quelen* (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio e Bertollo, 1990; Maistro *et al.*, 2002). Casos de RONS múltiplas, embora raros, também já foram descritos (Abucarma e Martins-Santos, 2001), sendo que estas, embora apresentem maior número de sítios, mantêm o mesmo padrão de distribuição. O número e a localização das RONS também tem sido confirmados pela

coloração por CMA3 e localização de genes ribossomais 18S (Garcia *et al.*, 2003; Swarça *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2007).

No presente trabalho, foi possível observar que o par cromossômico nucleolar manteve-se conservado entre populações que apresentavam o mesmo cariótipo e que os cromossomos portadores das RONS presentes nas diferentes fórmulas cariotípicas, apresentaram tamanho bastante similar quando comparados. Muito possivelmente, este par cromossômico deve ser compartilhado entre as diferentes formas cromossômicas já identificadas, uma vez que estes são, em geral, um dos poucos cromossomos a apresentarem blocos heterocromáticos característicos, os quais são coincidentes com as RONS. Porém, apenas com técnicas de bandamento mais refinadas ou de microdissecção, é que esta hipótese poderá ser plenamente testada.

Em peixes, existem poucas informações referentes à localização do gene ribossomal 5S. Os dados até agora obtidos foram bastante variáveis entre as diferentes espécies estudadas, demonstrando que estes genes podem estar presentes em um único par cromossômico (Martins e Galetti Jr., 1999, 2000; Kavalco *et al.*, 2004), ou em mais pares (Vicente *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Kavalco *et al.*, 2004a); podendo ser encontrados em sintenia com os genes ribossomais 45S (Pendás, *et al.*, 1994; Kavalco *et al.*, 2004a, Centofante *et al.*, 2006) e até mesmo em cromossomos sexuais (Morán *et al.*, 1996).

No presente trabalho foi observado o predomínio dos clusters de DNAr 5S em posição pericentromérica. Segundo Martins e Galetti Jr. (1999), a localização destes sítios em posição interna estaria relacionada com um maior grau de proteção destas seqüências, evitando eventos de transposição e crossing, mais freqüentes em áreas mais terminais. Este fato poderia estar relacionado com o alto grau de conservação destas

seqüências em relação aos genes de RNAr 45S, os quais geralmente localizam-se nas regiões subteloméricas. A localização não sintênica com os genes de RNAr 45S observada é considerada uma condição frequente em peixes (Martins e Galetti Jr., 2000).

Com exceção da população de Mariápolis, que apresentou dois pares de cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S, possivelmente resultado de uma translocação, as demais populações de *R. quelen* apresentaram apenas um par cromossômico portador destes genes, cuja localização pericentromérica também é mantida. O que tem sido observado dentre os Siluriformes é uma grande variabilidade no que se diz respeito ao número e localização dos genes ribossomais 5S, tanto entre os gêneros, como entre espécies (Kavalco *et al.*, 2004a, Garcia, dados não publicados), sendo que das espécies estudadas até o momento, *R. quelen* é uma das poucas que apresenta um conservadorismo do cromossomo portador destes cístrons ribossômicos. A conservação do número e localização dos genes ribossomais 5S também já foi relatada em outras espécies de peixes, como é o caso de alguns representantes dos gêneros *Astyanax* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002) e *Schizodon* (Martins e Galletti Jr., 2000).

Os heptapterídeos, de modo geral, apresentam pouca quantidade de heterocromatina, a qual se encontra distribuída predominantemente nas regiões pericentroméricas e terminais (Swarça *et al.*, 2003), sendo que marcações intersticiais (Vissoto *et al.*, 1999; Margarido e Moreira-Filho, 2008) e polimorfismos envolvendo regiões heterocromáticas (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Almeida-Toledo e Garcia, 2008) também já foram relatados. Os representantes deste grupo de peixes apresentam, em sua maioria, cromossomos pequenos e as bandas obtidas apresentam-se, geralmente, pálidas, dificultando a observação das regiões heterocromáticas.

Estudos realizados em *R. quelen* demonstraram uma pequena quantidade de heterocromatina distribuída pelos cromossomos do complemento, onde as RONS são, geralmente, umas das poucas regiões heterocromáticas visíveis (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio *et al.*, 2000; Fenocchio *et al.*, 2002; Stivari e Martins-Santos, 2004). Em algumas populações não portadoras de cromossomos supranumerários, foi observada a presença de um ou dois pares de cromossomos metacêntricos médios que apresentam marcações conspícuas de heterocromatina nas regiões terminais de ambos os braços (Roman *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2008).

Cromossomos supranumerários são uma característica cariotípica encontrada em diferentes populações de *R. quelen* presentes em diferentes sistemas hidrográficos. O fato de alguns destes cromossomos apresentarem morfologia e padrão de bandamento C semelhantes em populações com composições cariotípicas divergentes (presente trabalho, Maistro *et al.*, 2002; Fenocchio *et al.*, 2003) sugere que estes cromossomos possuem uma origem evolutiva comum anterior à diversificação cromossômica do grupo; e que a presença de diferentes cromossomos supranumerários em populações com mesma fórmula cariotípica seria um forte indicativo de que estes cromossomos apresentam evolução independente.

De maneira geral, indivíduos de *R. quelen* de uma mesma população compartilham um único tipo de cromossomo supranumerário, sendo que ainda não há relatos para a espécie da presença de mais de um tipo desses cromossomos em um mesmo indivíduo. Os cromossomos supranumerários de *R. quelen* podem variar em número e presença entre as células dos indivíduos portadores, esta situação foi observada para todas as populações analisadas no presente estudo, o que indica que estes cromossomos possuem um comportamento irregular durante a divisão celular,

provavelmente devido à ausência de comportamento mendeliano durante este processo (Jones e Rees, 1982). Outros grupos de peixes, como *Astyanax* e *Prochilodus*, podem apresentar mais de um tipo de cromossomo supranumerário dentro da população (Néo *et al.*, 2000), sendo que em alguns casos pode-se considerar que estes cromossomos possuem estabilidade mitótica (Salvador e Moreira-Filho, 1992) e que há, até mesmo, uma distorção de segregação desses entre os sexos (Vicente *et al.*, 1996).

Existem atualmente algumas propostas sobre a possível origem dos cromossomos supranumerários, entre estas, as mais aceitas são a não-disjunção de um cromossomo autossômico e a formação de isocromossomos (Carvalho *et al.*, 2008). Segundo Moreira-Filho *et al.* (2004), o fato da maioria dos cromossomos supranumerários serem do tipo metacêntrico já seria um forte indício de que estes teriam se originado a partir de isocromossomos. Mestriner *et al.* (2000) através da técnica de FISH obtiveram resultados sobre a localização de segmentos gênicos que fortemente suportam o fato de que o grande supranumerário metacêntrico de *A. scabripinnis* seria um isocromossomo originado a partir do 24^o par cromossômico do complemento A. Maistro *et al.* (2002) também propõem que os cromossomos adicionais de *R. quelen* sejam isocromossomos originados a partir de uma divisão transversa na região centromérica de um dos cromossomos do complemento A que possuísse pequenos blocos heterocromáticos localizados em sua região terminal, o que explicaria o padrão de bandamento C biterminal dos cromossomos supranumerários.

Segundo Fenocchio e Bertollo (1990, 2000), Abucarma e Martins-Santos (2001), e Maistro *et al.* (2002), o padrão de bandas heterocromáticas em ambas as regiões terminais de cromossomos metacênicos corresponde ao padrão de distribuição de heterocromatina dos cromossomos supranumerários. Entretanto, cromossomos

metacêntricos menores com o esse mesmo padrão de bandamento, totalmente eucromáticos ou totalmente heterocromáticos, também são observados em *R. quelen* (presente trabalho, Garcia *et al.*, 2003, Abucarma e Martins-Santos, 2001, Moraes *et al.*, 2007).

A presença de cromossomos metacêntricos com ambas as regiões terminais heterocromáticas é evidenciada no complemento cromossômico padrão de outras espécies das famílias Auchenipteridae, Doradidae, Heptapteridae e Pimelodidae (Carvalho e Dias, 2004; Souza *et al.*, 2004; Garcia, 2005), inclusive em algumas populações de *R. quelen* nas quais não foram observados cromossomos supranumerários (Roman *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2008). Como as marcações banda C+ nestes cromossomos são conspícuas, e facilmente observadas em relação aos pequenos e pálidos blocos heterocromáticos presentes nas regiões terminais dos cromossomos de *R. quelen*, este fato poderia indicar que os cromossomos supranumerários desta espécie teriam se originado a partir de cromossomos do complemento padrão, muito possivelmente, como resultado de uma não-disjunção cromossômica. Após sua origem estes cromossomos adicionais possivelmente passaram por diferentes processos evolutivos, que envolveram a perda de regiões eucromáticas ou das regiões heterocromáticas terminais, o que explicaria o fato de os cromossomos supranumerários médios apresentarem sempre o padrão de BC biterminal, enquanto que os cromossomos supranumerários pequenos podem ser eucromáticos, heterocromáticos ou parcialmente heterocromáticos (Fig. 3.10).

Segundo Silva e Yonega-Yassuda (2004), quando os cromossomos supranumerários são originados por não-disjunção, esta é seguida por uma série de mudanças na estrutura cromossômica, por processos de mutação ou rearranjos

cromossômicos que resultam na completa perda de homologia e da capacidade de pareamento desses cromossomos com os cromossomos do complemento A. Estes eventos poderiam explicar a ausência de cromossomos do complemento padrão com bandas C+ biterminais em populações portadoras de cromossomos supranumerários e o porquê estes ainda podem ser encontrados em populações que não apresentam cromossomos adicionais.

A presença de diferentes tipos de cromossomos supranumerários em *R. quelen* e sua grande variação numérica (presença de até sete cromossomos em um indivíduo), pode ser explicada levando-se em consideração que os cromossomos supranumerários são elementos inertes e dispensáveis, e modificações em sua estrutura e número talvez não afetem os indivíduos portadores, de forma que estes cromossomos passam a ser fixados nas populações (Néo *et al.*, 2000).

Os dados obtidos no presente trabalho, associados aos dados citogenéticos disponíveis na literatura para *R. quelen*, indicam que muitas das características cariotípicas deste grupo mostram-se conservadas, como o número diplóide, número e posição das RONS e sítios de DNAr 5S e até mesmo o padrão de bandamento C dos cromossomos do complemento padrão. A grande variabilidade na macroestrutura dos cromossomos é possivelmente resultado de rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos com o predomínio de inversões. Ainda não é possível estabelecer um padrão cariotípico que diferencie as populações e regiões hidrográficas que estas habitam, uma vez muitas características cromossômicas são compartilhadas entre estas populações, inclusive a presença, morfologia e estrutura dos cromossomos supranumerários. Para isso, seria necessário um aumento dos estudos desta natureza dentro do grupo, buscando cobrir a maior área possível da distribuição desta espécie

dentro das bacias hidrográficas, uma vez que os estudos já realizados envolvem populações geograficamente distantes e não fornecem subsídios para inferências sobre a existência de possíveis formas híbridas ou da existência de fluxo gênico entre populações que apresentam a mesma fórmula cariotípica e cromossomos supranumerários diferenciados.

Em resumo, os dados apresentados auxiliam no melhor entendimento do padrão cromossômico e da biodiversidade apresentada por *R. quelen*, levantando questionamentos interessantes sobre a possível origem e evolução dos cromossomos supranumerários presentes em diversas populações destes animais.

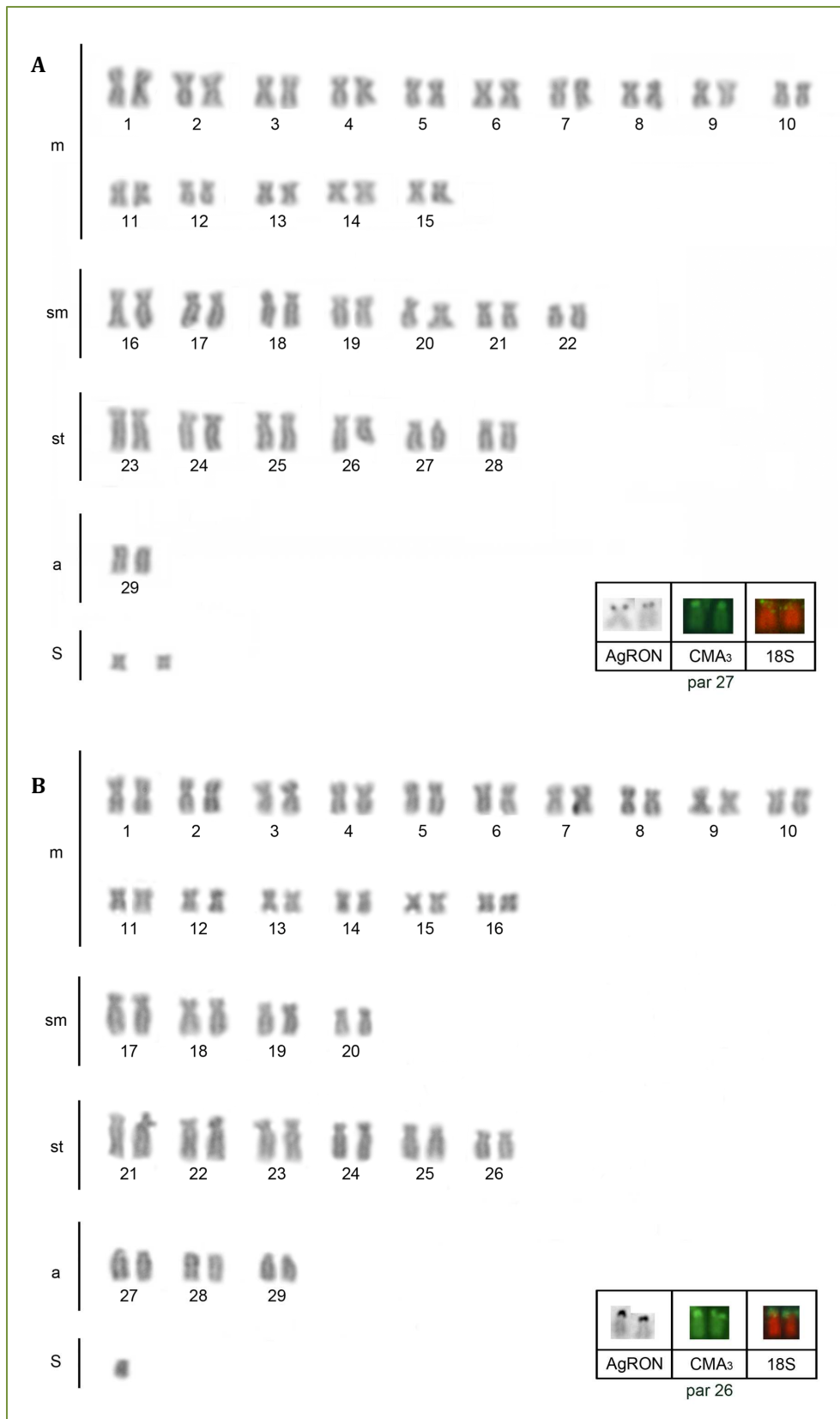


Figura 3.1: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Santo Antônio do Pinhal e **B:** Córrego Sangão - Cascavel. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

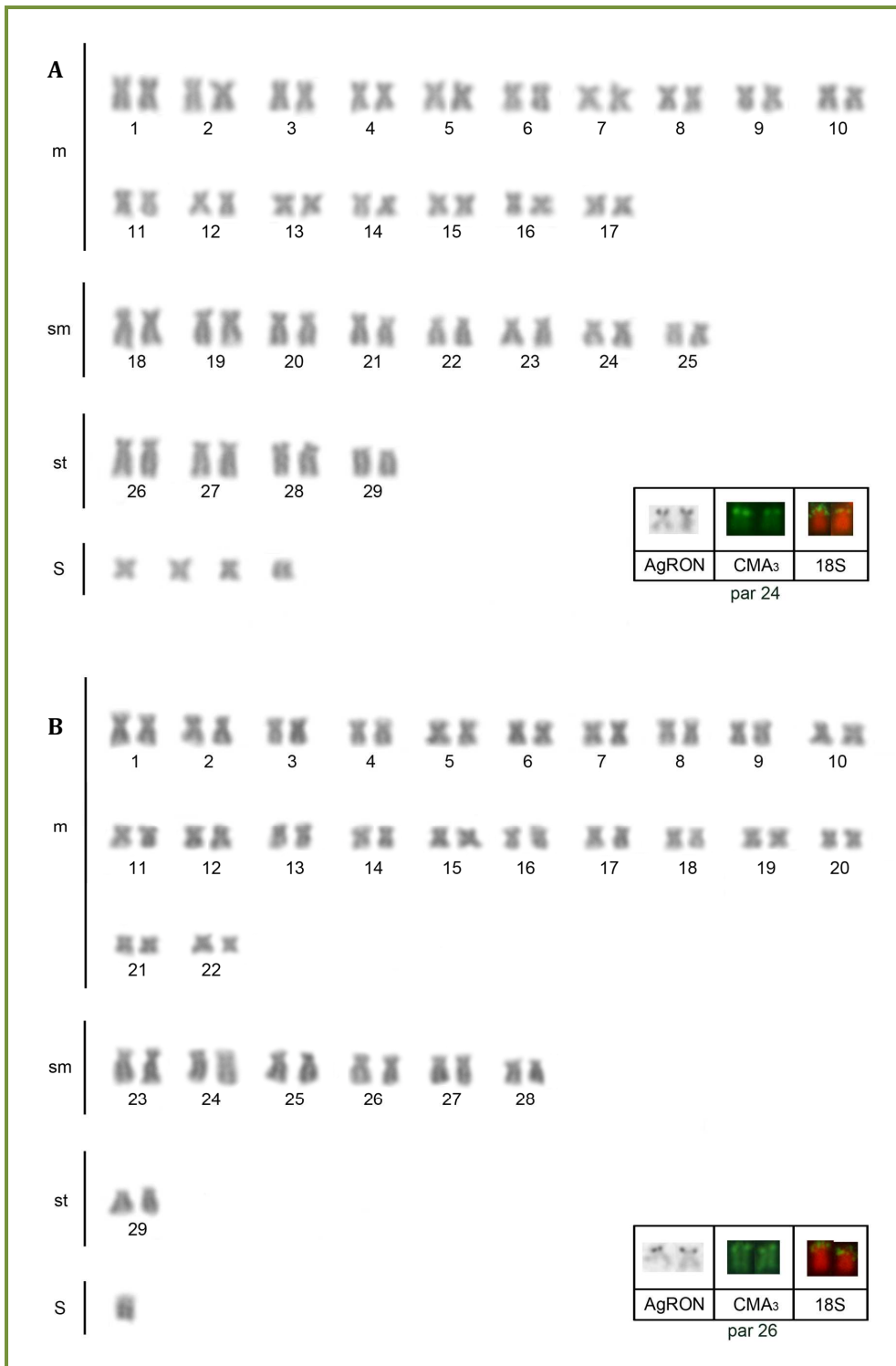


Figura 3.2: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Ipeuna e **B:** Botucatu. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

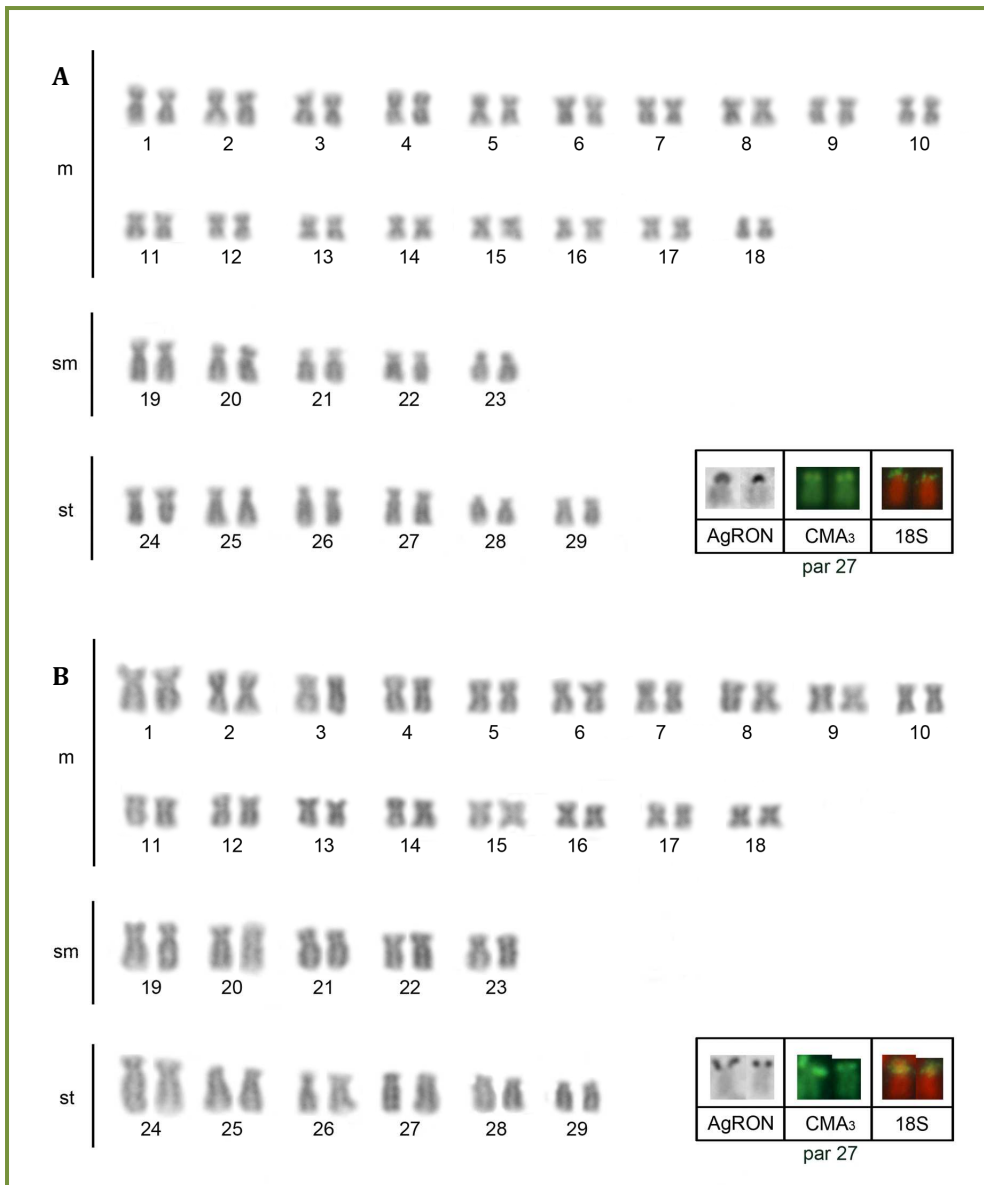


Figura 3.3: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** rio do Oeste - Cascavel e **B:** Iguape. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

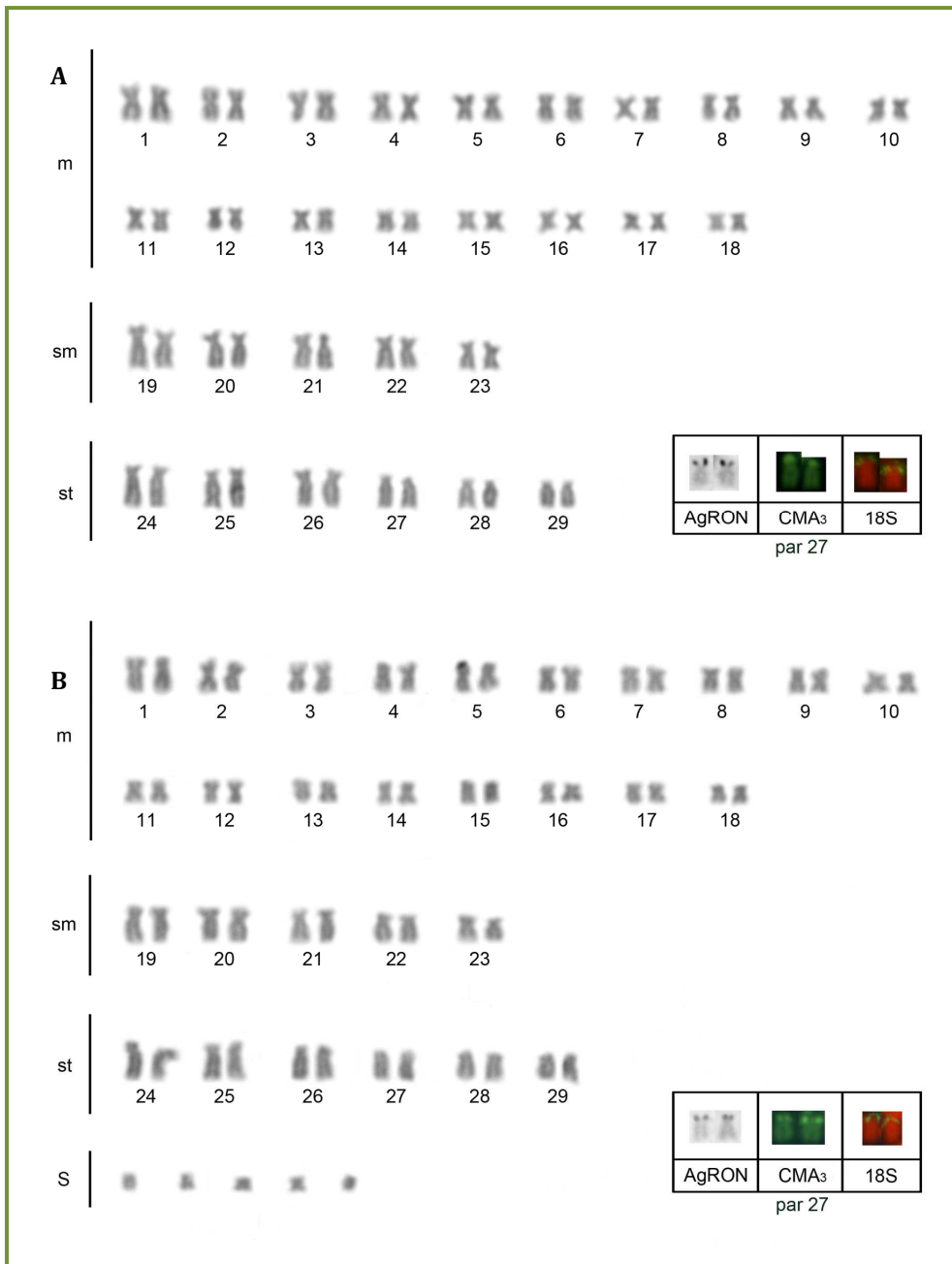


Figura 3.4: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Guapiara e **B:** Colina. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

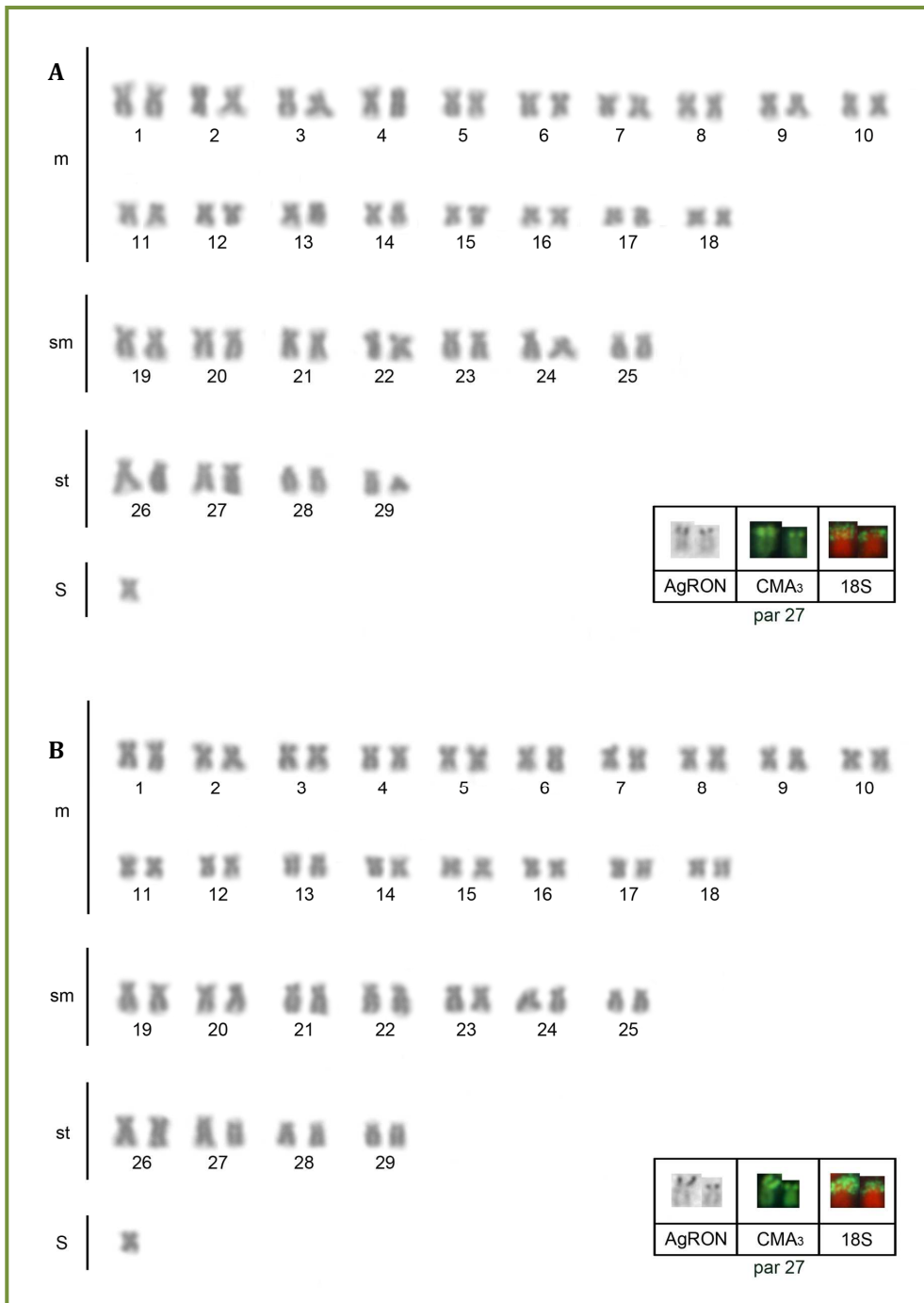


Figura 3.5: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** rio São José e **B:** rio Paraíba do Sul. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

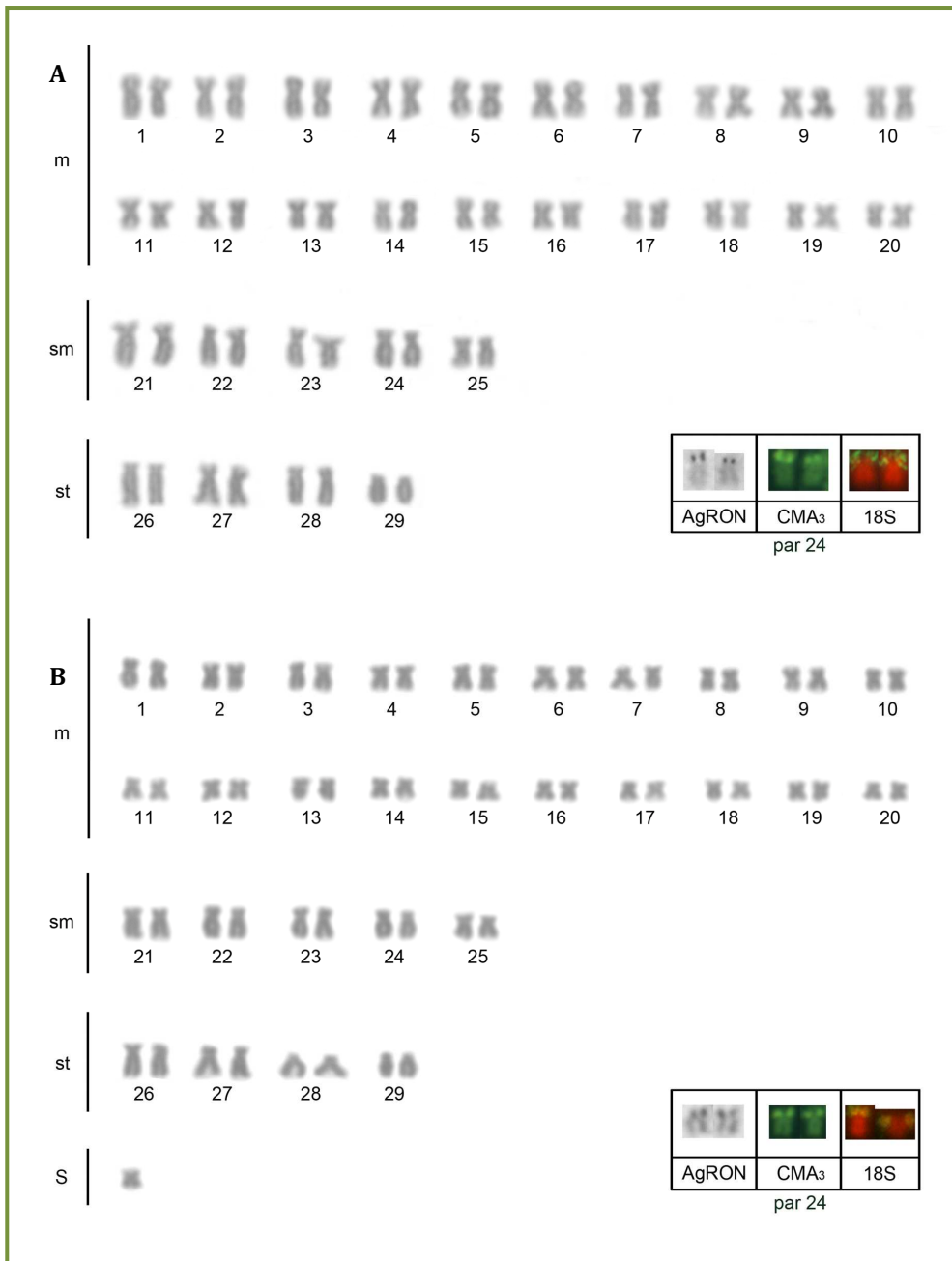


Figura 3.6: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Angra dos Reis e **B:** Mariópolis. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

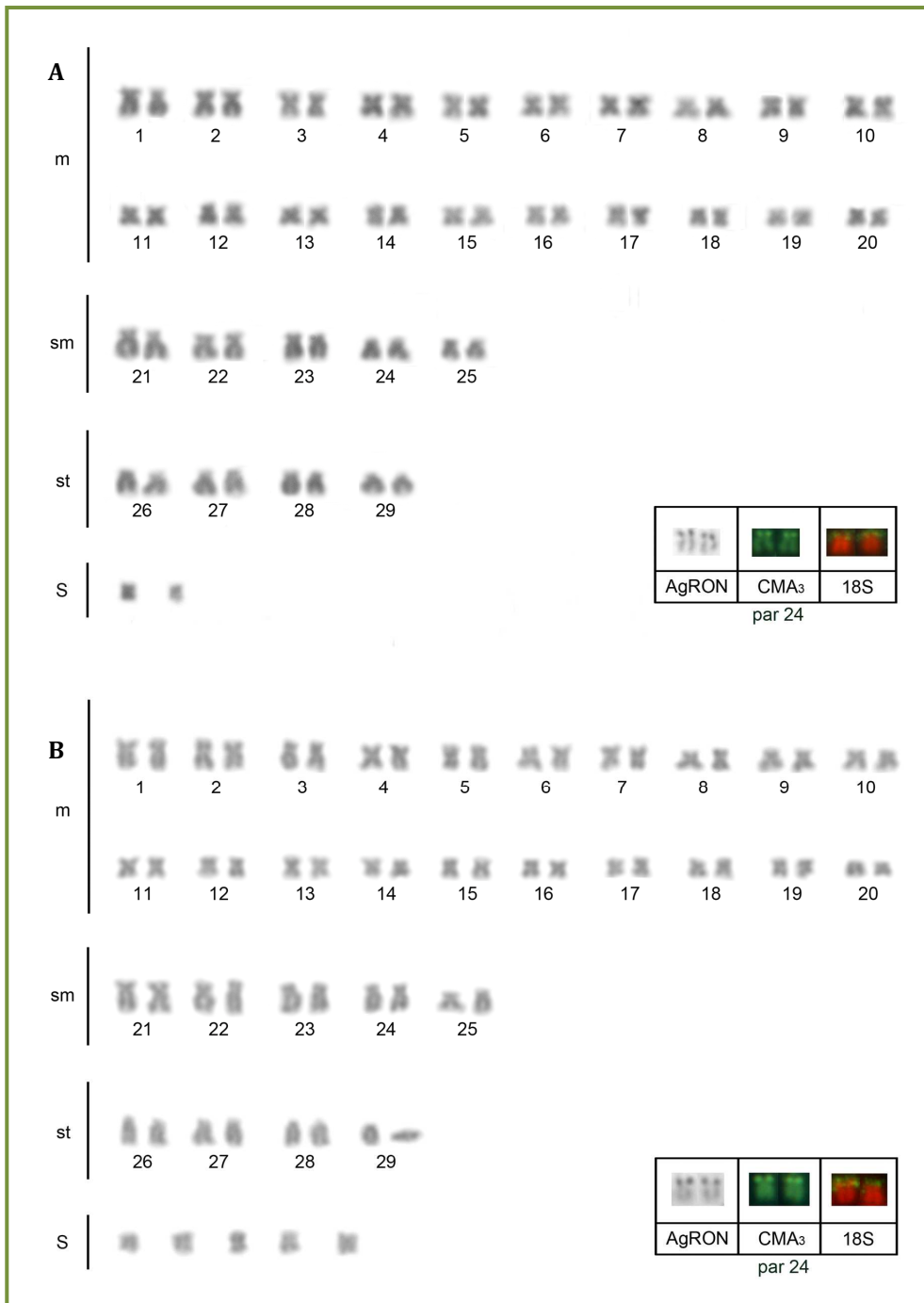


Figura 3.7: Cariótipos corados com Giemsa das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Piquete e **B:** Araras. Em destaque o par cromossômico nucleolar após impregnação por nitrato de prata (AgRON), coloração por CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S.

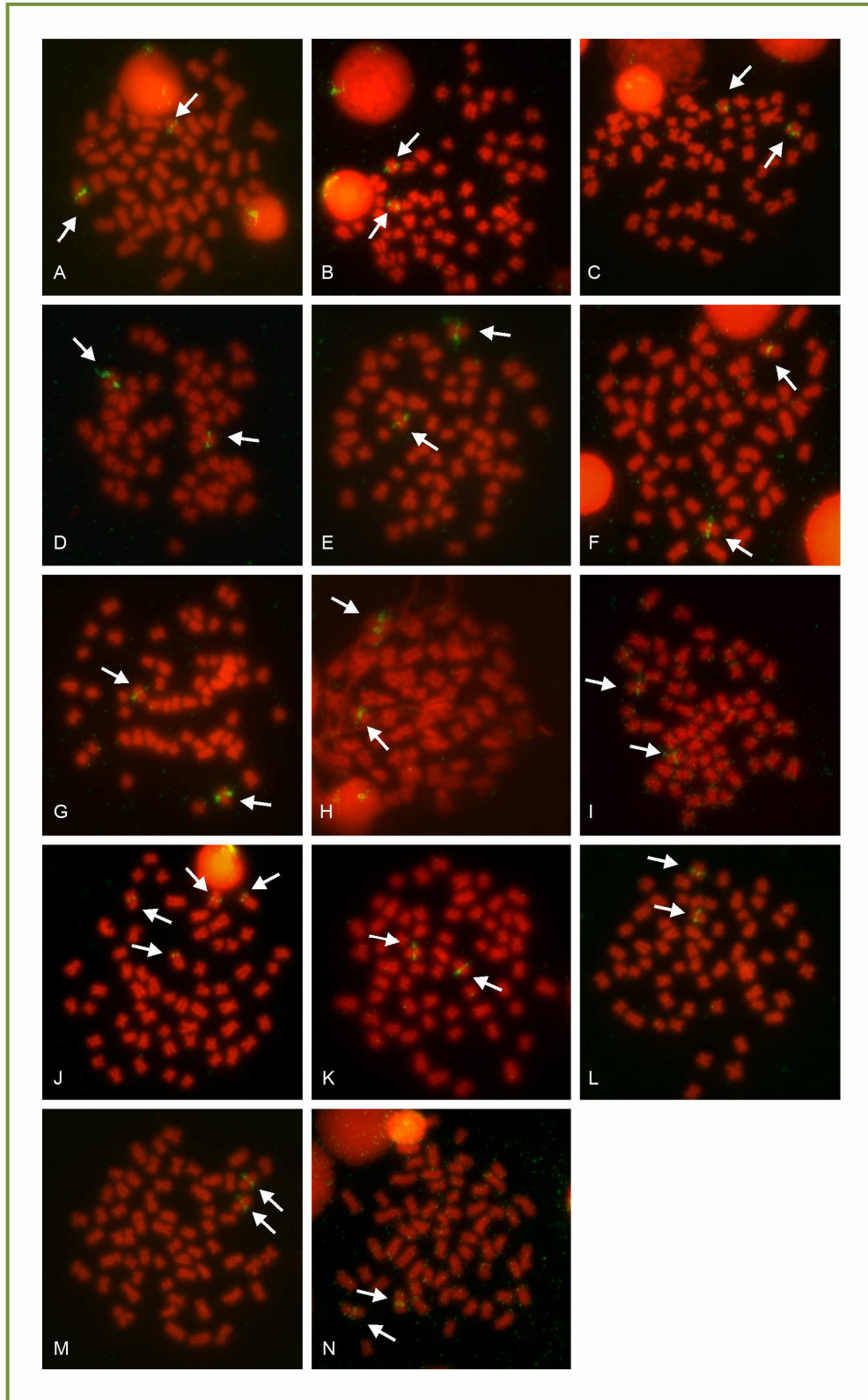


Figura 3.8: Metáfases somáticas de *R. quelen*, as setas indicam os sítios de DNAr 5S identificados através da FISH nas populações provenientes de **A:** Angra dos Reis, **B:** Araras, **C:** Botucatu, **D:** Rio do Oeste – Cascavel, **E:** Corrego Sangão – Cascavel, **F:** Colina, **G:** Guapiara, **H:** Iguape, **I:** Ipeuna, **J:** Mariápolis, **K:** Piquete, **L:** rio Paraiba do Sul, **M:** rio São José, **N:** Santo Antônio do Pinhal.

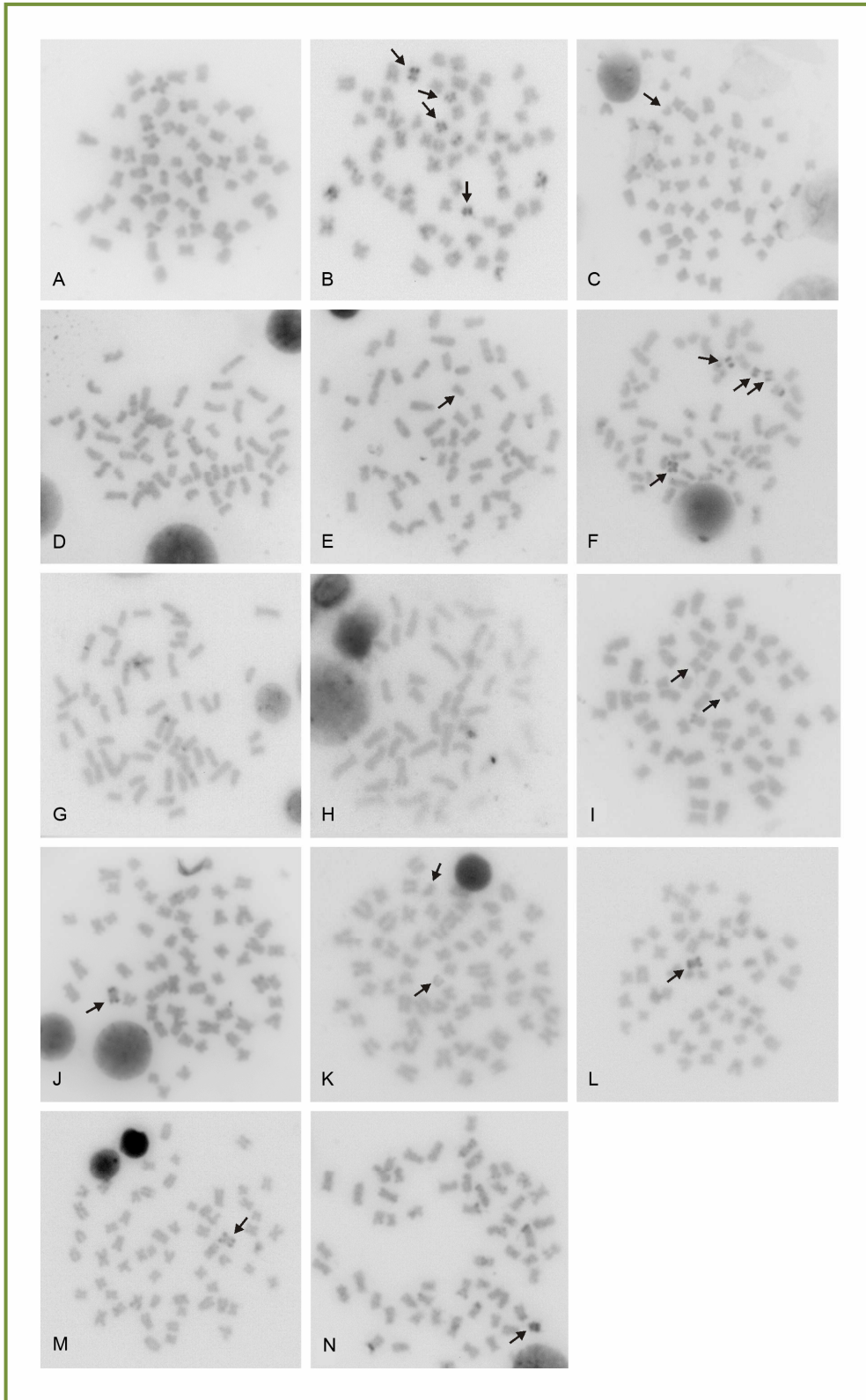


Figura 3.9: Metáfases somáticas submetidas ao bandamento C das populações de *R. quelen* provenientes de **A:** Angra dos Reis, **B:** Araras, **C:** Botucatu, **D:** Rio do Oeste – Cascavel, **E:** Corrego Sangão – Cascavel, **F:** Colina, **G:** Guapiara, **H:** Iguape, **I:** Ipeuna, **J:** Mariópolis, **K:** Piquete, **L:** rio Paraiba do Sul, **M:** rio São José, **N:** Santo Antônio do Pinhal. As setas indicam os cromossomos supranumerários.

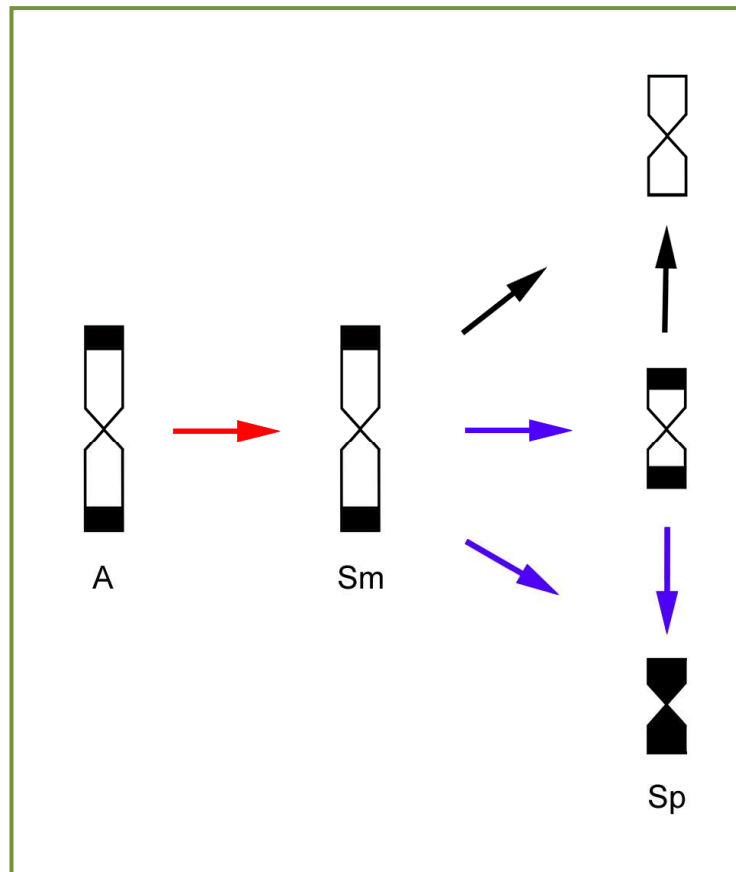


Figura 3.10: Esquema representativo do possível mecanismo de origem dos cromossomos supranumerários metacêntricos médios (Sm) em *R. quelen* a partir de um evento de não-disjunção (seta vermelha) de um cromossomo metacêntrico médio do complemento A. Após este processo os cromossomos supranumerários seguiram caminhos evolutivos independentes, de forma que estes ou permaneceram como cromossomos metacêntricos médios, ou passaram por processos que resultaram em alterações de seu tamanho e estrutura, tais como a perda de regiões eucromáticas (setas azuis) ou perda de regiões heterocromáticas (setas pretas). Na figura as regiões escuras indicam blocos de heterocromatina constitutiva.



Capítulo 3

Capítulo 3

DETERMINAÇÃO DE RELAÇÕES EVOLUTIVAS E OCORRÊNCIA DE COMPLEXOS DE ESPÉCIE EM *Rhamdia* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) COM BASE NO SEQUENCIAMENTO DE GENES MITOCONDRIAIS.

Palavras-chave: complexo de espécies, DNAm, filogenia, haplótipo, sistemática molecular, *Rhamdia*.

Resumo

O gênero *Rhamdia* é composto, atualmente, por 12 espécies, e compreende um dos grupos de Heptapteridae que possui a maior distribuição na região Neotropical. Os dados citogenéticos e moleculares disponíveis demonstram uma grande variabilidade genética para o gênero, reforçando a hipótese da ocorrência de “complexos de espécie” em *Rhamdia*, principalmente na espécie mais estudada até o momento, *R. quelen*. O presente trabalho buscou testar a hipótese da ocorrência de “complexos de espécie” no gênero, bem como inferir as relações evolutivas entre algumas das espécies de *Rhamdia* encontradas na América Central e América do Sul, através do sequenciamento de genes mitocondriais. Nas análises foram utilizadas cinco regiões mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b, ND2 e D-loop), totalizando 3047 caracteres analisados para 131 exemplares de sete espécies de *Rhamdia*, representando 48 drenagens ao longo da região neotropical. As análises filogenéticas demonstraram que o gênero *Rhamdia* não é monofilético, assim como a espécie *R. quelen*, para qual foi confirmada a ocorrência de

um “complexo de espécies”. A equivalência dos grupos “ Cis-Andinos” e “Trans-Andinos” propostos em trabalhos anteriores foi recuperada. As análises também identificaram a existência de linhagens haplotípicas bem diferenciadas e que apresentaram estruturação filogeográfica, indicando que eventos de especiação alopátrica possuem importante papel na diversificação do gênero. Dentro do que até o momento era reconhecido como *R. quelen* foram identificados 15 grupos bem definidos, sustentados por altos valores de *bootstrap* e índice de Bremer, e a esses grupos foram atribuídas nomenclaturas de outras espécies do gênero que hoje encontram-se sinonimizadas em *R. quelen*, indicando a necessidade de uma revisão taxonômica para o gênero *Rhamdia*, baseada não apenas em dados morfológicos, como também em dados genéticos.

Introdução

Os Siluriformes compreendem um grupo extremamente rico e diverso de peixes, cujos representantes são encontrados nas águas doces ou salgadas de praticamente todos os continentes. Esta ordem, considerada a segunda maior dentre os Vertebrados, é uma das mais representativas nas águas intercontinentais do neotrópico (Nelson, 2006; Lundberg e Freil, 2003). Devido à ampla distribuição apresentada por estes animais e sua grande variedade de hábitos, associadas ao grande número de espécies descritas, e a descrever, a sistemática desse grupo permanece confusa.

A taxonomia dos peixes neotropicais baseia-se, de modo geral, em caracteres morfométricos e merísticos, que podem sofrer sobreposição entre as espécies, além disso, faltam caracteres diagnósticos suficientemente fortes para distinguir espécies morfologicamente semelhantes (Perdices *et al.*, 2002). A maioria dos estudos sistemáticos em Siluriformes foi direcionada aos níveis taxonômicos superiores (de

Pinna e Vari, 1995; de Pinna, 1993, 1998; Reis, 2003), de forma que há poucos estudos enfocando a análise das relações entre as espécies de um gênero ou as relações entre os gêneros de uma família (Lundberg *et al.*, 1991a; Bockmann, 1998; Oliveira e Britski, 2000).

A família Heptapteridae, endêmica da região Neotropical, reúne peixes de pequeno e médio porte, representando uma das maiores radiações de bagres nesta região (de Pinna, 1998). Contando com um grande número de espécies descritas, em sua maioria taxonomicamente complexas e pouco estudadas do ponto de vista genético, este grupo de peixes compõe um interessante grupo de estudo.

Dentre os heptapterídeos o gênero *Rhamdia* é um dos gêneros que apresenta distribuição mais ampla, tendo sido descrito, praticamente, para todas as bacias hidrográficas da região Neotropical (de Pinna, 1998). Esses peixes, popularmente conhecidos como Jundiás, apresentam hábitos generalistas, sendo geralmente encontrados nos fundos de pequenos rios e córregos. Algumas espécies de *Rhamdia*, ao contrário do observado para outros gêneros de Siluriformes, podem ser encontradas vivendo em simpatria (Silfvergrip, 1996).

A primeira espécie de *Rhamdia* foi descrita por Bleeker (1858), e desde então, muitos estudos taxonômicos foram realizados no gênero, de forma que, cerca de 100 espécies válidas foram descritas, fazendo com que o gênero *Rhamdia* fosse considerado um dos mais especiosos dentro da família Heptapteridae. Entretanto, o monofiletismo desse gênero nunca foi confirmado (Silfvergrip, 1996).

O mais aprofundado estudo taxonômico sobre o gênero *Rhamdia*, foi efetuado por Silfvergrip (1996) em sua tese de doutorado (dados não publicados). Esse estudo sinonimizou em apenas 11 as quase 100 espécies descritas para o gênero. Silfvergrip

reconheceu também a falta de caracteres diagnósticos robustos na identificação de espécies de Siluriformes e ressalta que um dos motivos das falhas neste processo está justamente na falta de estudos que englobem a distribuição total de uma espécie, uma vez que para o autor, populações muito distantes geograficamente podem apresentar características morfológicas que sugiram sua diferenciação. Entretanto quando populações ao longo dessa distribuição são amostradas, o que se observa é uma graduação (*cline*) dessas características, o que descarta a possibilidade da existência de duas espécies distintas.

O gênero *Rhamdia* é, também, um dos gêneros de Siluriformes mais representativo em ambientes troglóbios, de forma que cerca de oito espécies desse gênero foram descritas em cavernas ao longo da região Neotropical. Uma característica interessante da revisão de Silfvergrip (1996) é o fato de esta não levar em consideração os traços troglomórficos na descrição de espécies. Segundo o autor, tais características podem ser resultado de evolução paralela, tendo surgido várias vezes em diferentes grupos de maneira independente. Desse modo, quando uma população de caverna apresenta uma graduação dos caracteres troglomórficos/epígeos é difícil identificar se este fato se deve a cruzamento com migrantes ou é resultado de endocruzamento. Com base nisso, Silfvergrip agrupou todas as espécies cavernícolas do gênero descritas até 1996 em dois grupos, *R. laticauda* e *R. quelen*, formados principalmente por formas epígeas. Muitas das propostas taxonômicas atuais levam em consideração a revisão de Silfvergrip (1996), não considerando os organismos troglóbios como espécies válidas. Entretanto, alguns taxonomistas discordam deste ponto de vista, de forma que pelo menos três novas espécies cavernícolas de *Rhamdia* foram descritas recentemente.

Em estudos mais recentes, Bockmann (2007) reconheceu como válida a espécie troglóbia *R. enfurnada* (Bichuette e Trajano, 2005), endêmica da Serra do Ramalho (BA – Brasil), de forma que o gênero passou a ser composto por 12 espécies, das quais oito (*R. enfurnada*, *R. foina*, *R. itacaiunas*, *R. jequitinhonha*, *R. laukidi*, *R. muelleri*, *R. poeyi* e *R. quelen*) são encontradas no Brasil. Destas espécies, destaca-se *R. quelen*, que, com base no trabalho de Silfvergrip (1996), passou a sinonimizar outras 47 espécies, sendo a única espécie de *Rhamdia* encontrada ao longo de toda a extensão Neotropical (do sul do México ao sul da Argentina). *R. quelen* é também, a espécie de *Rhamdia* que apresenta maior distribuição pelos rios brasileiros, sendo a única espécie do gênero descrita para algumas das principais bacias hidrográficas, como os rios das bacias que cortam o sul e sudeste do país.

Com relação a estudos filogenéticos, as revisões taxonômicas realizadas no gênero até o momento não buscaram estabelecer as relações filogenéticas das espécies de *Rhamdia* e nem levaram em consideração os dados cromossômicos disponíveis (Swarça *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2003). Os dados citogenéticos demonstram uma elevada variabilidade cromossômica dentro do grupo, sugerindo que o número real das espécies do gênero poderia estar subestimado e que as espécies atualmente reconhecidas como válidas poderiam compor “complexos de espécies”.

Perdices *et al.* (2002) apresentaram a primeira análise filogenética molecular no gênero, centrando seus estudos nas espécies encontradas na América Central. Através de dados de sequenciamento de genes do DNAm, os estudos filogenéticos demonstraram uma estruturação geográfica dos haplótipos obtidos e a existência de dois grandes clados para a América Central, que foram denominados “clado *laticauda*” e “clado *guatemalensis*”. Estes dois clados formaram, junto com um terceiro grupo, o

chamado “clado *cinerascens*”, um grande clado monofilético, intitulado pelos autores de “clado Trans-Andino”. Como grupo irmão do “clado Trans-Andino”, tem-se o “clado Cis-Andino”, formado pelos indivíduos de *R. quelen* provenientes da América do Sul (bacias do Orinoco, Amazonas e Paraná). A estimativa do tempo de divergência entre as espécies estudadas demonstrou que o gênero *Rhamdia* teve origem na América do Sul e, possivelmente, invadiu a América Central na época da formação dos Andes (oito milhões de anos), diversificando-se posteriormente nas espécies atuais encontradas na região.

Os dados obtidos por esses autores mostraram que a classificação proposta por Silfvergrip (1996) é falha em diversos pontos, indicando que algumas espécies reconhecidas como válidas pelo autor, na verdade não o são, enquanto que outras espécies que foram sinonimizadas precisariam ser reavaliadas.

Uma questão interessante, levantada nesses estudos, envolve a distribuição de *R. quelen*, que de acordo com os dados de DNAm não atingiria a América Central, de forma que a distribuição desta espécie seria bem menor e estaria restrita à América do Sul. Os dados moleculares também mostraram a existência de diferentes linhagens evolutivas dentro do clado Cis-Andino, indicando que *R. quelen*, sob a classificação taxonômica atual, compreenderia provavelmente um “complexo de espécies” (Perdices *et al.*, 2002).

O presente trabalho seguiu a classificação proposta por Silfvergrip (1996) e incluiu uma análise filogenética de diferentes espécies de *Rhamdia* provenientes de algumas das principais bacias sul-americanas através do estudo de sequenciamento de regiões do mitogenoma, buscando informações que possibilitassem uma melhor compreensão das relações evolutivas entre as espécies do gênero e que também auxiliassem na classificação taxonômica destes animais.

Materiais e métodos

Amostragem, Extração de DNA e sequenciamento

Para as análises evolutivas foram utilizados como grupo interno exemplares das seguintes espécies de *Rhamdia*: *R. enfurnada*, *R. itacaiunas*, *R. laukidi* e *R. quelen*, sendo selecionados, quando possível, de quatro a seis indivíduos por ponto de coleta para a amplificação dos genes mitocondriais. Os espécimes utilizados encontram-se listados na Tabela 3 (Materiais e Métodos), que também contém informações sobre os locais de coleta e as drenagens as quais pertencem. Como representantes do grupo externo foram utilizados um exemplar de cada uma das seguintes espécies: *Acentronichthys leptos*, *Imparfinis mirini* e *Pimelodella meeki*, ambas representantes da família Heptapteridae. Também foram empregadas nas análises sequências dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8 e Citocromo b de *R. cinerascens*, *R. guatemalensis*, *R. laticauda* e *R. quelen*, obtidas no GenBank e provenientes do trabalho de Perdices *et al.* (2002).

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). O DNA foi quantificado e diluído em solução de uso com concentração de 20ng/μL.

Regiões de quatro genes mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b, ND2) e da região controle D-loop foram selecionadas para a reconstrução da filogenia, de forma que para as reações de PCR foram utilizados os seguintes pares de primers:

1. ATPase 6 e 8: ATP8.2-L8331 (5'-AAA GCR TTR GCC TTT TAA AGC-3') + CO3.2-H9236 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C-3') (Sivasundar *et al.*, 2001), que amplificam um segmento de aproximadamente 900pb, 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).

2. 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.
3. ND2: Met-L4437 (5'-AAG CTT TCG GGC CAT ACC-3') + DN2-H4980 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C- 3') (Sivasundar *et al.*, 2001) que geram fragmentos de cerca de 550pb referentes às sequências parciais do RNA transportador da metionina e da subunidade 2 do gene da NADH-desidrogenase (ND2).
4. D-loop: F-TTF (5'- GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA -3') + F-12R (5'GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG -3') (Sivansundar *et al.*, 2001) que hibridam nos genes para tRNA flanqueadores da região D-loop, amplificando um fragmento de aproximadamente 1.100 pb.

As reações foram realizadas em termociclador PTC-110 Programmable Thermal Controller - MJ Research e cada reação de PCR apresentou um volume final de 25 µL (1µL de DNA molde [20ng/µL], 1µL de cada primer [10pM], 1.5 µL de MgCl₂ [25mM], 2.5µL de tampão [10x], 2.5 µL de dNTP [10µM], 0.25µL [5U]de Taq polimerase - Fermentas, 15.25µL de água destilada). As condições da PCR foram as seguintes: 94°C (4 min), cinco ciclos de: 92°C (30 seg), 53°C (30 seg), 72°C (90 seg), 40 ciclos de: 92°C (30 seg), 56°C (30 seg), 72°C (90 seg), seguidos por uma elongação final a 72°C (10min) e um período de resfriamento a 4°C. Para confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, estes foram aplicados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e

digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

Após purificação do produto de PCR (kit ChargeSwitch PCR Clean-up - Invitrogen), procedeu-se a reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye™ Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As cadeias leve e pesada do DNAm_t foram sequenciadas em sequenciador modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems.

Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram visualizadas e editadas através do programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) e para obtenção das sequências consenso entre as sequências da cadeia leve e pesada do DNAm_t, fez-se uso do programa Gene Runner v.3.05. As sequências foram então verificadas no GenBank ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando para tanto o programa “BlastN”, averiguando assim, a similaridade destas com sequências de DNAm_t de outros peixes. Em seguida as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW 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 através do programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2007).

Após a obtenção das sequências gênicas e sua concatenação, foi realizada a verificação dos haplótipos existentes dentro das amostras. Cada haplótipo recebeu um código de identificação relacionado com o local de coleta e espécie (Tabela 3 – Materiais e Métodos). Amostras de localidades muito próximas e que apresentaram o mesmo

haplótipo, receberam o mesmo código identificador. Quando diferenças entre as sequências (incluindo diferenças de um par de bases) eram observadas, atribuía-se a estas um código de letras associado ao código identificador.

A verificação do nível de saturação das substituições nas sequências analisadas foi realizada com auxílio do programa DAMBE (Xia e Xei, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). A distância genética entre as amostras foi estimada com auxílio do programa PAUP (Swofford, 2002) com base no melhor modelo evolutivo de substituição nucleotídica determinado através do uso do programa Modeltest 3.0 (Posada e Crandall, 1998).

As análises filogenéticas utilizando o método de Neighbor-joining (NJ) foi realizada através do programa MEGA4.0 (Kumar *et al.*, 2007) utilizando o modelo de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 1993). As análises de Máxima Parcimônia (MP) foram implementadas no programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com o algoritmo de rearranjo de ramos “tree bisection and reconnection” (TBR), sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram considerados como dados ausentes.

Para a análise de MP foram também calculados os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR), índice de consistência rescalonado (CR). O índice de decaimento de Bremer (IB) (Bremer, 1994) foi calculado com o auxílio do programa TreeRot 2.0 (Soreson, 1999).

Os valores de *bootstrap* (BT)(Felsenstein, 1985), foram calculados utilizando-se de 1000 réplicas, sendo que apenas grupos com frequência maior do que 50% foram retidos. Valores de *bootstrap* entre 50-70 foram considerados fracos, entre 70-90 bons e iguais ou superiores a 90, fortes.

Resultados

Foram obtidas as sequências dos quatro genes mitocondriais e da região controle D-loop para 117 indivíduos de *R. quelen*, 12 indivíduos de *R. enfurnada* e um indivíduo de *R. itacaiunas* e *R. laukidi*, totalizando 48 drenagens e 131 exemplares analisados. Com a exceção das amostras de *R. quelen* provenientes de Santo Antônio do Pinhal/SP (qInSP8a,b), nas quais alguns indivíduos apresentaram haplótipos bem diferenciados entre si, dentro das demais localidades foi observada a existência de apenas um haplótipo padrão, sendo que em alguns casos (qInPR2a,b; qInPR4a,b; qInRS1a,b e qInSP4a,b; qInSP7a,b), a diferença de um ou dois pares de bases entre as sequências obtidas também foi considerada nas análises. Como muitos indivíduos dentro de uma população compartilhavam o mesmo haplótipo, optou-se por sua retirada na realização da reconstrução filogenética final, de forma que, nestes casos, cada população foi representada por um único indivíduo. Populações diferentes e que apresentaram o mesmo haplótipo (qInRJ3=qInRJ5) foram consideradas nas análises, sendo assim, no total, foram utilizadas 53 sequências de *Rhamdia*, que somadas às sequências retiradas do GenBank, totalizaram 60 haplótipos utilizados para as análises filogenéticas.

A caracterização da informação filogenética contida em cada uma das partições mitocondriais empregadas no presente estudo encontra-se disponível na Tabela 5. Nenhum dos genes apresentou códons de parada quando traduzidos em sequências de aminoácidos. A verificação do grau de saturação, obtida pela da curva de substituição através da plotagem do número de transições e transversões versus a distância genética, não evidenciou saturação para os genes ATPase 6 e 8, Citocromo b, ND2, região D-Loop e para as todas as sequências concatenadas (Fig. 4.1).

As reconstruções filogenéticas a partir dos critérios de NJ e MP foram realizadas, inicialmente, com cada gene em separado (dados não mostrados), e as topologias recuperadas foram então comparadas entre si com o objetivo de identificar possíveis conflitos, e como estes não foram observados, partiu-se para a análise simultânea das sequências combinadas.

Em uma tentativa de diminuir o ruído que resultou no grande número de árvores (449) obtidas na análise de MP, uma nova análise foi realizada. Nesta nova análise foram incluídos apenas alguns terminais representativos dos clados mais politômicos, bem com um único haplótipo por localidade de coleta quando estes diferiam por, pelo menos, dois nucleotídeos. Esta análise parcial resultou em seis árvores mais parcimoniosas, cuja árvore consenso (Anexo 1) apresentou as mesmas relações observadas na árvore de MP inicial, sendo estas suportadas, basicamente, pelos mesmos valores de BT e IB. Desta forma, para a realização do presente trabalho, optou-se pela análise envolvendo todas as linhagens haplotípicas identificadas.

As árvores de NJ (Fig. 4.2 e 4.3) e MP (Fig. 4.4) apresentaram, essencialmente, a mesma relação entre os taxa, porém, as relações de parentesco recuperadas entre alguns clados foram distintas dependendo do método de reconstrução empregado. As mesmas relações entre os grupos foram observadas independentemente do representante do grupo externo utilizado para o enraizamento da árvore filogenética. Os grupos externos mantiveram-se na base da árvore, sendo que o gênero *Acentronichthys* mostrou-se mais distante geneticamente do gênero *Rhamdia*, enquanto que o gênero *Pimelodella* apresentou maior proximidade genética.

Tabela 5: Caracterização das regiões mitocondriais das amostras de *Rhamdia* analisadas no presente trabalho.

	Regiões mitocondriais				
	ATPase 6 e 8	Citocromo b	ND2	D-loop	Regiões concatenadas
Nº total de sítios	805	750	512	1007	3074
Nº de sítios conservados	479	450	306	403	1638
Nº de sítios informativos para parcimônia	255	250	153	359	1017
Composição nucleotídica					
% G	12,2	14,8	14,1	13,6	13,6
% A	30,8	26,6	30,9	31,5	29,8
% T	26,7	28,1	22,1	32,6	27,9
% C	30,3	30,5	32,9	22,3	28,7
Razão Ti/Tv	4,35	4,52	3,11	3,37	4,03
Nº de árvores obtidas	18	58	511	591	449
Nº de passos	946	851	493	1275	3624
IC	0,479	0,501	0,578	0,655	0,552
IR	0,702	0,729	0,749	0,760	0,724
ICR	0,336	0,365	0,433	0,498	0,399

Legenda: Ti = transições, Tv = transversões, IC = índice de consistência, IR = índice de retenção, ICR = índice de consistência rescalonado.

Em ambas as análises o gênero *Rhamdia* não é recuperado como monofilético, uma vez que, algumas amostras de *R. quelen* e *R. itacaiunas*, mostraram-se mais relacionadas com os grupos externos do que com outras espécies de *Rhamdia*. *R. itacaiunas* (itaMT1) apresentou uma maior relação de parentesco com uma amostra de *R. quelen* (qlnPA4), compondo um clado monofilético fortemente sustentado (BT = 100, IB =81). Situação semelhante foi observada para outra amostra de *R. quelen* (qlnPA3), que, apesar de ter sido coletada na mesma bacia hidrográfica de qlnPA4, representou

um clado monofilético em ambas as análises, sendo que esse clado também apresentou altos valores de suporte (BT = 100, IB = 60). Os valores de diversidade genética entre *R. itacaiunas* e destas duas amostras de *R. quelen* (qlnPA3 e qlnPA4) também foram elevados quando comparados com os valores apresentados entre os indivíduos que compõem o grupo interno, em média 20%.

A relação entre *R. cinerascens*, *R. guatemalensis* e *R. laticauda* observada por Perdices *et al.* (2002) também foi recuperada no presente estudo, de modo que estas espécies formaram um clado monofilético, equivalente ao clado “Trans-Andino” proposto pelos autores. As demais amostras de *Rhamdia* provenientes da América do Sul, incluindo as amostras de *R. quelen* cujas sequências foram obtidas do trabalho de Perdices, formaram um grande clado monofilético, que, a título de comparação, foi denominado clado “Cis-Andino”. Esta separação apresentou altos valores de suporte (BT = 99MP e 98NJ; IB = 25MP). Os valores de divergência nucleotídica entre os representantes Cis e Trans-Andinos foram elevados (em média 11%), quando comparados com os valores obtidos entre os indivíduos do mesmo grupo (Anexo 2).

Dentro do grande clado chamado de “Cis-Andino” observou-se uma forte relação entre as linhagens haplotípicas e as drenagens onde os indivíduos foram coletados, demonstrando um padrão de estruturação filogeográfica significativa, apesar da pouca resolução das relações evolutivas entre linhagens haplotípicas co-específicas. A espécie *R. quelen*, com base na classificação de Silfvergrip (1996), foi recuperada como polifilética a partir da perspectiva molecular, uma vez que, algumas amostras apresentaram valores significativos de divergência nucleotídica (Anexo 2). A título de comparação, quando possível, cada grupo recebeu o nome de uma espécie de *Rhamdia* válida ou que foi sinonimizada por Silfvergrip (1996) em *R. quelen*.

Dentro do clado “Cis-Andino” podemos considerar a existência de 14 grupos (clados) na topologia de NJ, e 15 na topologia de MP, sendo esses em sua maioria bem suportados por valores de *bootstrap* entre 70 e 100%. Com base nas análises filogenéticas realizadas foi possível observar que uma mesma drenagem pode abrigar mais de uma forma de *Rhamdia* embora, cada localidade amostrada tenha apresentado em geral, apenas uma linhagem haplotípica. O único caso de simpatria observado no presente estudo envolve as amostras coletadas em Santo Antônio do Pinhal/SP (qlnSP8a,b) cuja relação será melhor discutida no decorrer do texto.

O clado Venezuela formado por *R. quelen* (qlnVZ1), apresenta uma posição mais basal, mostrando-se como grupo irmão dos demais haplótipos que constituem o clado “Cis-Andino”, sendo esta relação de parentesco suportada por valor de *bootstrap* equivalente a 100%.

A amostra qlnPA2 compõe um segundo clado monofilético, o clado “*muelleri*”, que diferentemente do que foi esperado, não apresentou uma relação filogeográfica com as demais amostras de *R. quelen* provenientes de Altamira/PA (qlnPA3 e qlnPA4), uma vez que estas possuem valores elevados de divergência genética, agrupando em clados bem diferenciados.

Para a bacia do rio Amazonas, identificamos dois grupos de *Rhamdia*, o grupo “*laukidi*”, que reuniu o exemplar de *R. laukidi* (lauAM1) e outras duas amostras de *R. quelen* (qlnPA1 e qlnGY1) provenientes da bacia do rio Amazonas. O outro grupo, “*longicauda*”, presente nesta rede hidrográfica foi composto pela amostra de *R. quelen* proveniente da parte peruana da bacia Amazônica (qlnPE1).

Os grupos amazônicos mostraram-se mais relacionados, embora esta relação não seja fortemente sustentada (BT = 81NJ, 65MP; IB = 2), com o grupo “*pubescens*” formado

por amostras provenientes de diferentes bacias que cortam o estado do Mato Grosso (qlnMT1; qlnMT2; qlnMT3; qlnMT4 e qlnMT5), muitas dessas, como a bacia do rio Tapajós, possuem conexão com a bacia Amazônica, o que poderia explicar a proximidade evolutiva entre estas duas faunas. Dentro do grupo “*pubescens*” ainda é possível observar que mais de uma forma haplotípica bem diferenciada pode ser encontrada dentro da bacia do rio Tapajós, uma vez que qlnMT3 mostrou-se mais relacionada com qlnMT2 do que com qlnMT4 e qlnMT5. Esta relação é sustentada por valores de BT = 100% e altos valores de IB (19 e 34).

O grupo “*enfurnada*” formado por amostras de *R. enfurnada* (enfBA1) e *R. quelen* da parte média do rio São Francisco (qlnMG1; qlnBA1 e qlnBA2) e do Peru (qlnPE2), também mostrou-se mais relacionado com a fauna da bacia Amazônica.

A bacia do rio Paraná parece possuir pelo menos cinco grupos bem distintos de *Rhamdia*, sendo que quatro destes foram recuperados como monofiléticos na análise de NJ. Dois destes grupos, “*branneri*” (qlnARG1; qlnPR3; qlnPR4a,b) e “*voulezi*” (qlnPR2a,b) são encontrados no rio Iguaçu, na parte baixa da bacia do rio Paraná. Outros três grupos foram encontrados para a parte alta da bacia, o denominado grupo “*hilarii*”, que é encontrado na maioria das sub-bacias do Paraná no estado de São Paulo, tais como Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê (qlnSP1; qlnSP2; qlnSP3; qlnSP8a; qlnSP9; qlnSP13; qlnSP15), e na parte alta da bacia do rio São Francisco (qlnMG2; qlnMG3), o grupo “*parana*” (qlnSp4a,b) proveniente da calha principal do rio Paraná, que na análise de NJ foi incluído no clado “*branneri*”, e o grupo “*parapanema*” (qlnSP7a,b; qlnSP10), o único a formar um clado monofilético pouco suportado na topologia de MP (BT = 56, IB = 5).

O grupo “*straminea*” é formado pelas amostras de *R. quelen*, provenientes do criadouro da Universidade Federal de Santa Maria/RS. Este clado monofilético mostrou-se mais relacionado com os haplótipos provindos da bacia do rio Paraíba do Sul, sendo que esta relação é fracamente suportada na topologia de MP (BT = 66, IB = 2)

A bacia do rio Paraíba do Sul também parece abrigar duas formas distintas de *Rhamdia*, as formas pertencentes ao grupo “*cuprea*” (qlnRj1; qlnRj2; qlnRj3; qlnRj5; qlnRj6) que reúne os haplótipos provenientes da parte do rio Paraíba do Sul que banha o Rio de Janeiro, e as formas pertencentes ao grupo “*sebae*” que reúne haplótipos provenientes da parte paulista da bacia do rio Paraíba do Sul e de cidades do Estado do Rio de Janeiro próximas ao Estado de São Paulo banhadas pela mesma rede hidrográfica. Faz parte deste clado também a amostra do *R. quelen* coletada no rio Doce/ES (qlnES1). O grupo “*cuprea*” mostrou-se filogeneticamente mais relacionada com a fauna presente na bacia do Ribeira do Iguape, que constitui o grupo “*ribeira*” (qlnPR1; qlnSP12, qlnSP14, qlnSP16), fato que poderia ser explicado devido à história geológica comum entre estas duas bacias.

Apesar da divergência genética entre exemplares provenientes de uma mesma localidade ser baixa ou inexistente, no caso das amostras qlnSP8a,b coletadas no rio Preto no município de Santo Antônio do Pinhal, os valores de divergência foram altos (4%), sendo que qlnSP8a mostrou-se mais relacionada ao grupo “*hilarii*”, enquanto que qlnSP8b faz parte do grupo “*sebae*” (qlnES1; qlnRj4; qlnRj7; qlnSP5; qlnSP6; qlnSP8b; qlnSP11). Esta relação poderia ser explicada pelo fato do rio Preto se localizar em uma região limítrofe entre as bacias do rio Pardo e do rio Paranapanema, de modo que a mistura de faunas poderia se dar facilmente por escape e/ou ação humana. A ocorrência

de introgressão, entretanto, não pode ser confirmada, uma vez que no presente estudo não foram obtidos dados do genoma nuclear.

Discussão

O presente trabalho constitui um dos maiores estudos filogenéticos já realizados no gênero *Rhamdia*, tanto no que se diz respeito ao número de caracteres estudados, quanto ao número de espécies válidas envolvidas. Os dados aqui apresentados representam um importante passo para a compreensão das relações entre as espécies que compõem o gênero, um dos mais representativos nas águas doces neotropicais. A hipótese filogenética apresentada, baseada em diferentes regiões do genoma mitocondrial, envolve sete das 12 espécies reconhecidas para o gênero *Rhamdia* e ressalta a necessidade de uma revisão na proposta taxonômica vigente para esse grupo de peixes.

A análise das regiões mitocondriais escolhidas reforçaram a proposta de Perdices *et al.*, (2002) sobre a divisão das espécies de *Rhamdia* em um clado “Cis-Andino” e um clado “Trans-Andino”. A origem mais recente do clado “Trans-Andino”, formado pelas espécies *R. cinerascens*, *R. guatemalensis* e *R. laticauda*, também foi corroborada com base no comprimento dos ramos das árvores filogenética obtidas, porém, como não foi intuito do presente trabalho testar uma hipótese de relógio molecular, não foi possível confirmar a datação proposta pelos autores.

Os resultados obtidos diferiram em diversos pontos da revisão taxonômica de Silfvergrip (1996), principalmente com relação à validade das espécies propostas. Os dados de DNAm_t mostraram que o gênero *Rhamdia* não é monofilético, uma vez que, pelo menos duas espécies, *R. itacaiunas* e *R. quelen*, mostraram-se mais próximas

geneticamente de outros gênero da família Heptapteridae empregados como grupos externos, apresentando elevados valores de divergência genética em relação ao grupo interno utilizado. Com base nestes dados, podemos inferir que a espécie *R. itacaiunas* e as citadas amostras de *R. quelen* na verdade não são espécies válidas de *Rhamdia*, entretanto, seriam necessários outros dados genéticos e biológicos, bem como uma melhor análise morfológica, para que essa hipótese seja confirmada e estas espécies sejam então realocadas em outros gêneros da família Heptapteridae.

Na presente análise os dados de DNAm também não forneceram suporte para a equivalência evolutiva da espécie *R. quelen*. Esta espécie mostrou-se polifilética, sendo que muitas das amostras de *R. quelen* mostraram-se mais relacionadas filogeneticamente com outras espécies reconhecidas de *Rhamdia*, como pode ser observado nos grupos “*laukidi*” e “*enfurnada*”. Com base nos valores de divergência nucleotídica apresentados pelas espécies *R. laukidi* e *R. enfurnada* (cerca de 6%), estas poderiam ser consideradas espécies válidas.

Os dados mitocondriais confirmaram a existência de um “complexo de espécies” em *R. quelen*, identificando a ocorrência de diferentes espécies de *Rhamdia* dentro do que hoje é considerada a espécie *R. quelen*. Fowler (1950) chega a considerar, com base em dados morfológicos, a existência de 28 espécies de *Rhamdia* apenas para o Brasil. A proposta filogenética deste trabalho demonstrou que, pelo menos 12 grupos, formados por amostras de localidades brasileiras, e mais três grupos formados por amostras provenientes da América do Sul, podem ser considerados como unidades evolutivas válidas, sendo que muitas são coincidentes com propostas taxonômicas anteriores ao trabalho de Silfvergrip (1996), como, por exemplo, *R. hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1840), *R. pubescens* (Steindachner, 1876), *R. branneri* e *R. voulezi* (Haseman, 1911),

entre outras, enquanto outros grupos precisariam ser alvo de uma reformulação taxonômica para receberem uma denominação. Como o grande número de possíveis espécies encontrado no presente trabalho mostrou-se relacionado com propostas taxonômicas anteriores, descartam-se a atuação de efeitos resultantes do esforço de amostragem ou da escolha dos genes, como potenciais agentes que poderiam aumentar o número real de espécies dando origem a novos grupos com distribuição geográfica mais restrita (Agapow *et al.*, 2004), o que poderiam resultar em uma superestimativa do número real de espécies dentro do gênero *Rhamdia*.

Diferentemente de outros vertebrados, os peixes encontram-se confinados à água, apresentando maiores restrições quanto à sua dispersão. No caso dos peixes de água doce, seu confinamento aos sistemas hidrográficos, resulta em um estreito relacionamento entre a história das bacias e a história natural-evolutiva destes animais.

A separação das espécies de *Rhamdia* em um clado “Cis-Andino” e um clado “Trans-Andino”, segundo Perdices *et al.* (2002), mostrou-se coincidente com a ocorrência de eventos geológicos que resultaram na elevação dos Andes e na modificação do curso dos rios Orinoco e Amazonas, que passaram a drenar para o leste, resultando na bacia Amazônica moderna.

Aparentemente, a origem do gênero *Rhamdia* deu-se na região paleo-Amazônica, sendo que, posteriormente, este experimentou um processo de expansão e colonização, tanto da América Central (grupo “Cis-Andino”), como da América do Sul (grupo “Trans-Andino”).

Os dados paleogeográficos indicam que durante a formação das bacias hidrográficas atuais, inúmeros eventos de captura de cabeceiras podem ter ocorrido, o que explicaria a relação de parentesco observada entre algumas linhagens de peixes

presentes em sistemas hidrográficos diferenciados que apresentaram algum contato no passado.

A separação das bacias dos rios Amazonas e Paraná foi estabelecida, aparentemente, há cerca de 10Ma (Lundeberg *et al.*, 1998). Assumindo a origem amazônica do gênero *Rhamdia*, a conexão entre estes dois sistemas resultaria na colonização da bacia do Paraná e na proximidade genética observada entre estas duas faunas. A conexão da bacia Amazônica com a maioria dos rios presentes no estado do Mato Grosso também explicaria a relação de parentesco observada no presente trabalho para o clado "*pubescens*", uma vez que a separação entre as bacias do Paraguai e Araguaia é recente, cerca de 2Ma.

De maneira geral, o que se observou no presente trabalho é que haplótipos de uma mesma bacia hidrográfica são filogeneticamente mais relacionados entre si do que com os haplótipos presentes em outras bacias. Entretanto, para a bacia do rio São Francisco foram encontrados dois grupos haplotípicos bem distintos, um mais relacionado com a fauna amazônica e outro mais relacionado com a fauna da bacia do rio Paraná. Estudos genéticos realizados em outros grupos de peixes também evidenciaram esta mesma relação (Moysés, 2005), indicando que a fauna do alto rio São Francisco é mais relacionada com a fauna presente no alto rio Paraná, enquanto que a fauna presente na porção média do rio São Francisco mostra-se mais relacionada com a fauna amazônica. Esta relação poderia ser explicada através de eventos de captura de rios das bacias dos rios Pardo e Araguaia pela bacia do rio São Francisco. Com base nas amostras estudadas no presente trabalho, estas duas regiões da bacia do São Francisco formam dois grupos genéticos distintos, sendo que estes permanecem estruturados dentro da bacia, uma vez que a troca genética entre eles encontra-se dificultada por barreiras físicas,

como a Barragem de Três Marias. A relação observada não pode ser extrapolada para a região do baixo rio São Francisco, uma vez que nenhuma amostra representativa desta parte do sistema hidrográfico foi incluída na presente análise.

A bacia do rio Paraná é considerada por alguns autores como um importante centro de endemismo (Castro *et al.*, 2005). Os dados de DNAmT indicam que pelo menos cinco grupos distintos de *Rhamdia* são encontrados nesta rede hidrográfica. O grupo formado pelas amostras do rio Paranapanema foi o único a apresentar-se monofilético na análise de MP. Situação semelhante foi observada no gênero *Astyanax* por Kavalco (2008). Esta diferenciação da ictiofauna presente no baixo rio Paranapanema em relação aos demais grupos presentes na parte alta da bacia do rio Paraná, pode ser explicada pelas inúmeras quedas d'água presentes ao longo do curso do Paranapanema e que funcionam como uma barreira física que impede o fluxo gênico entre as espécies ali encontradas. Dados de RAPD utilizados na caracterização de populações de *Pimelodus maculatus*, indicaram que as quedas d'água são realmente efetivas em impedir o fluxo gênico entre o alto e baixo Paranapanema, resultando na estruturação e diferenciação das populações (Almeida *et al.*, 2003).

A maior proximidade genética, observada através dos dados de DNAmT, entre as faunas presentes nas bacias do rio Ribeira de Iguape e a bacia dos Rios Costeiros, dentre eles o rio Paraíba do Sul, dão suporte a hipótese de que estas duas regiões foram conectadas no passado. Esta hipótese também explicaria a relação do grupo "*pubescens*" com os grupos "*cuprea*", "*sebae*" e "*ribeira*", uma vez que, no passado, a bacia do rio Uruguai, aparentemente manteve contato tanto com o rio Iguaçu, como com rios das bacias dos Rios Costeiros (Ribeiro, 2006). Estudos genéticos em andamento indicam a existência de pelo menos dois grupos distintos de *Rhamdia* para o rio Uruguai, sendo

que estes se mostraram mais relacionados com a fauna presente na bacia do baixo rio Paraná (Alves, inf. pessoal). Esses dados, associados aos dados obtidos no presente estudo, indicam a existência de pelo menos três grupos genéticos presentes nesta drenagem.

Com relação aos hábitos troglomórficos apresentados pela espécie *R. enfurnada*, preservar seu status taxonômico com base nestes indicaria a necessidade de se rever a taxonomia de todas as outras possíveis espécies troglóbias do gênero. Neste caso, baseando-se nos dados moleculares que indicam que a divergência entre *R. enfurnada* e as amostras de *Rhamdia* da parte média da bacia do rio São Francisco é praticamente inexistente, sugere-se que este grupo passe a seguir a classificação proposta para o grupo epígeo. O fato de que as modificações morfológicas responsáveis pela adaptação à vida em cavernas aparentemente surgiram mais rapidamente do que a divergência genética entre estes organismos, associada ao baixo grau de troglomorfismo apresentado por *R. enfurnada* em comparação a outros organismos troglóbios (Bichuette e Trajano, 2005), sugere que o grupo "*enfurnada*" ainda não é composto por unidades evolutivas isoladas, reforçando a proposta de que o grupo seja renomeado.

Inferências sobre as relações mais antigas dentro do gênero *Rhamdia* são dificultadas, uma vez que o grupo analisado apresenta divergência muito recente (Fig. 4.2), de forma que até mesmo genes mitocondriais, os quais apresentam maiores taxas evolutivas em comparação com genes nucleares, podem não ser totalmente informativos neste caso para a determinação das relações filogenéticas (Funk e Omland, 2003). As politomias basais encontradas no presente trabalho, provavelmente são resultados do curto tempo de divergência entre os taxa analisados, uma vez que os efeitos de saturação foram descartados.

Em grande parte, a dificuldade em se estabelecerem as relações evolutivas em muitos grupos de peixes neotropicais se deve à falta de estudos que envolvam a taxonomia dos níveis infra-familiares, dificuldade na identificação desses animais e ao pequeno número de estudos genéticos voltados para este fim (Perdices *et al.*, 2002; Kavalco, 2008).

A abordagem utilizada no presente trabalho se utiliza 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, que emprega diferentes genes mitocondriais e/ou genes nucleares, 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, que, quando utilizados individualmente apresentam pouco sinal filogenético, são incorporados à análise, uma vez que o ruído observado nas análises individuais pode então ser dissipado na análise conjunta (Queiroz *et al.*, 1995).

Os dados obtidos deixam claro que o gênero *Rhamdia* é composto por diferentes espécies ou subespécies geográficas que, embora semelhantes na aparência, constituem grupos genéticos diferentes. O fato de algumas espécies de peixes que se encontram amplamente distribuídas apresentarem ausência de divergência fenotípica, indica que uma forte seleção estabilizadora ou algum tipo de canalização de desenvolvimento atua na expressão de suas características morfológicas (Martin e Bermingham, 2000). Nessas espécies, as análises cromossômicas e moleculares podem fornecer importantes

informações. No caso do gênero *Rhamdia*, sua ampla distribuição, associada à grande diversidade de ambientes ocupados por suas espécies e ao pequeno tamanho de suas populações, aumentam as possibilidades de especiação por alopatria bem como as possibilidades de divergência dentro do gênero. Este fato, associado à falta de caracteres morfológicos diagnósticos, que permitam a clara identificação das espécies, poderiam resultar em uma subestimativa do número real de unidades evolutivas dentro do gênero *Rhamdia*, como pôde ser observado pelo número de grupos bem sustentados obtidos no presente trabalho em relação ao número de espécies estudadas. Muito provavelmente, com a ampliação do poder de amostragem para as drenagens mais representativas da América do Sul e com a inclusão das outras espécies válidas de *Rhamdia* que não foram analisadas no presente trabalho, o número de espécies reais neste grupo mostre-se ainda mais subestimado.

As informações obtidas através de estudos moleculares têm se mostrado uma importante ferramenta na resolução de conflitos taxonômicos e no auxílio de estudos morfológicos, sendo que em muitos casos os dados moleculares indicam a necessidade de uma revisão na classificação taxonômica vigente (Bermingham e Martin, 1998; Martin e Bermingham, 2000, Perdices *et al.*, 2002, Vergara *et al.*, 2008). Os dados reunidos no presente trabalho, assim como no trabalho de Perdices *et al.*, (2002), evidenciaram a necessidade de uma revisão taxonômica mais cuidadosa do gênero *Rhamdia* destacando a necessidade de se conciliar à classificação morfológica com os dados genéticos, e de se levar em consideração mais do que apenas um desses pontos de vista na identificação das espécies de peixes, principalmente em grupos cuja morfologia não fornece caracteres suficientemente fortes.

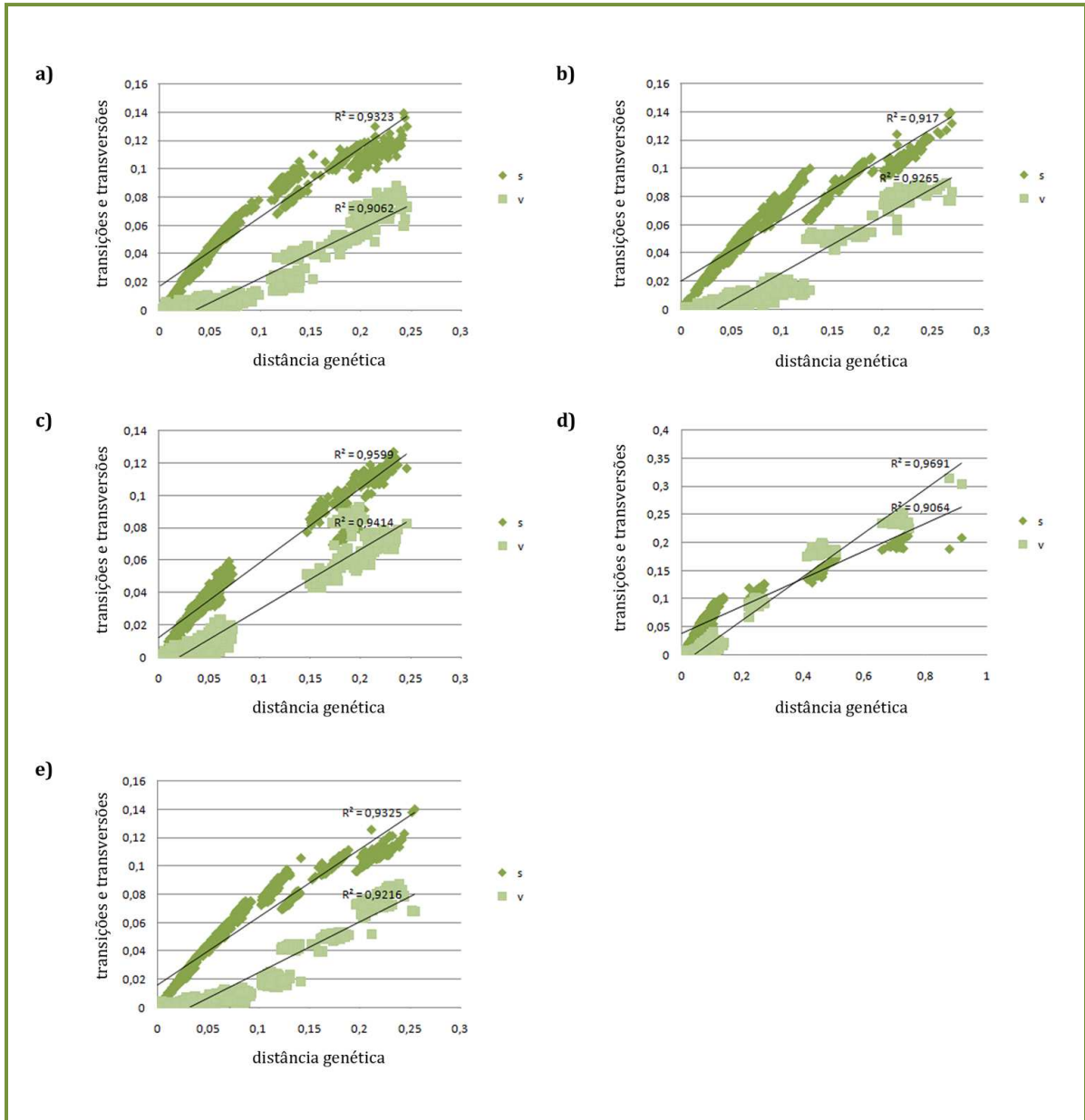


Figura 4.1: Gráficos da frequência observada de transições (S) e transversões (V) versus a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para os genes (a) ATPase 6 e 8, (b) Citocromo b, (c) ND2, (d) região D-loop, (e) todas as regiões gênicas concatenadas.

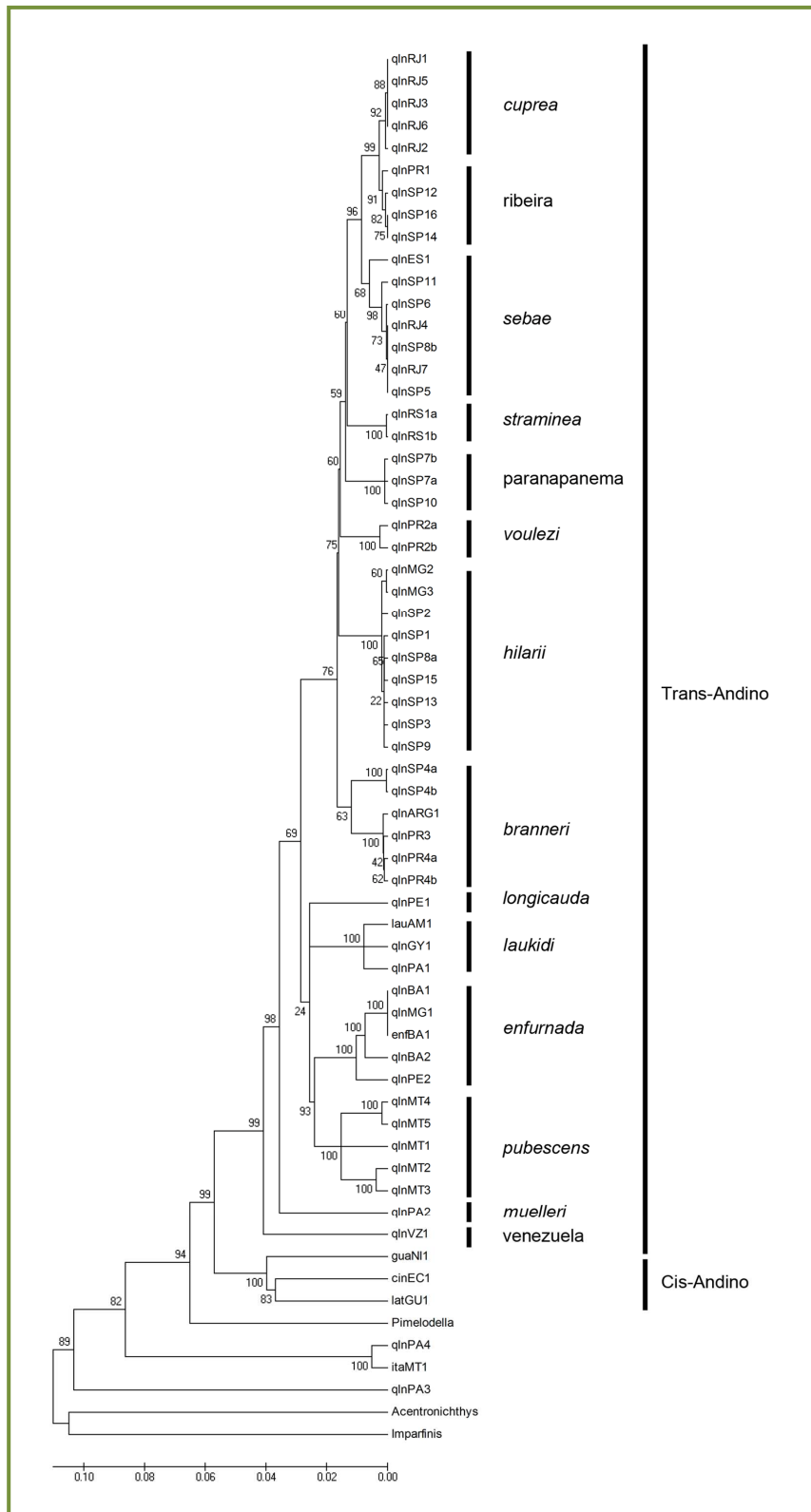


Figura 4.2: Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a filogenia, assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se na Tabela 3 (Materiais e Métodos).

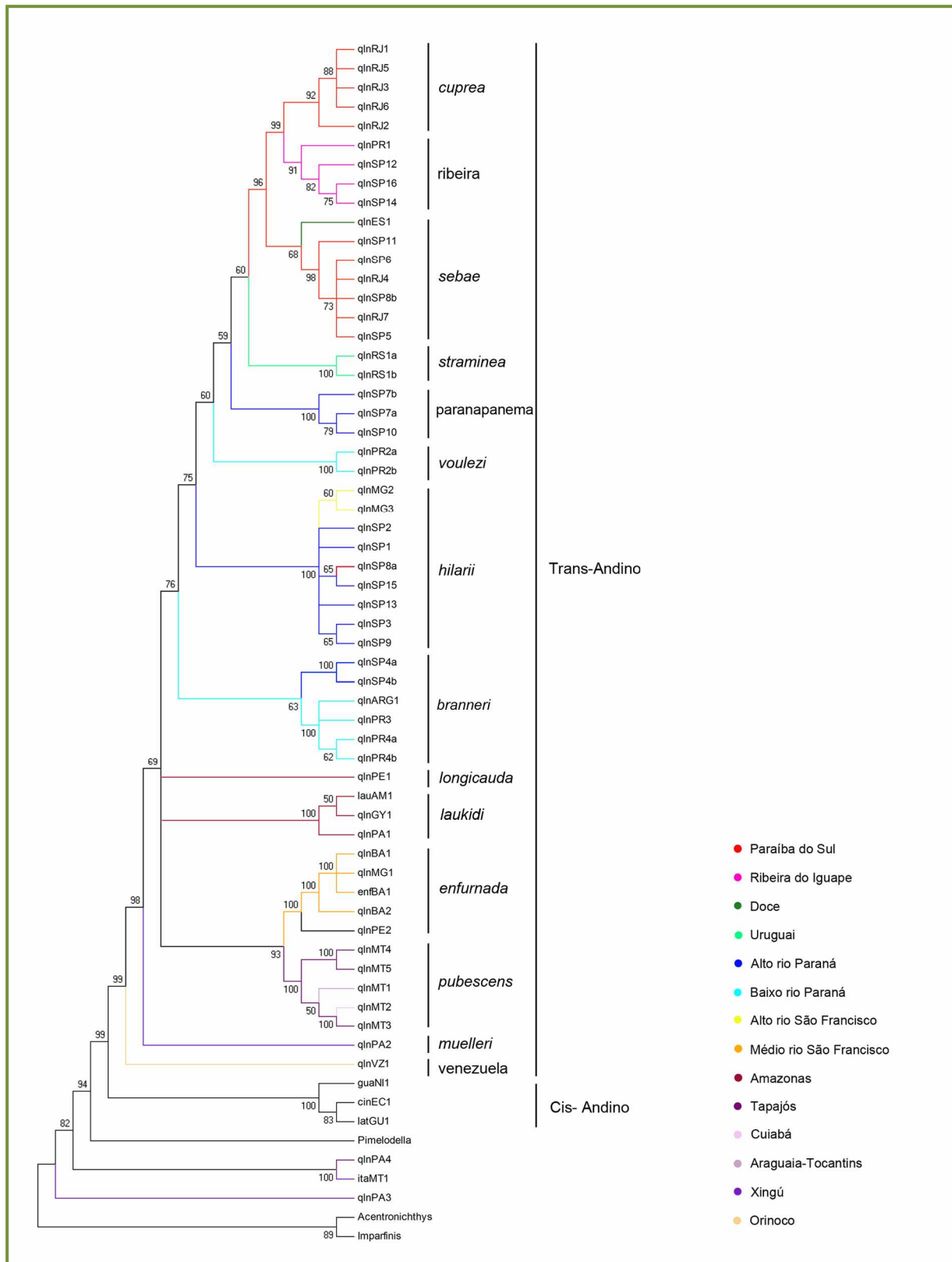


Figura 4.3: Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Os valores de *bootstrap* para 1000 replicações encontram-se acima dos ramos. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos).

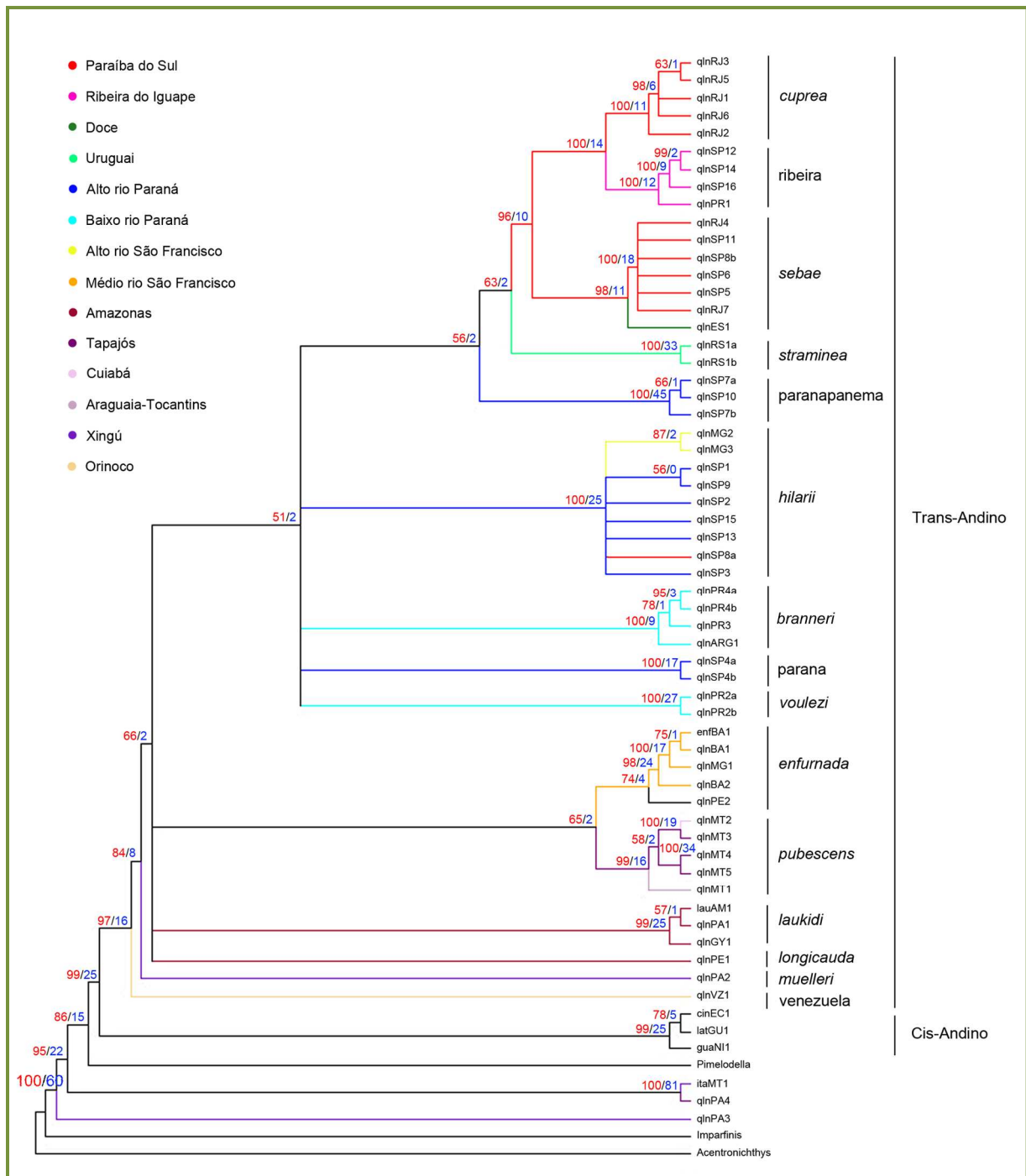


Figura 4.4: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia com base nas seqüências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Árvore consenso das 449 árvores mais parcimoniosas obtidas. Os valores em vermelho correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em azul aos valores de índice de Bremer. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos).



Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Através dos dados obtidos no presente trabalho foram inferidas as relações evolutivas entre algumas das espécies reconhecidas para o gênero *Rhamdia*, tanto com base em caracteres cromossômicos, como com base em dados de sequenciamento de diferentes regiões do genoma mitocondrial.

O gênero *Rhamdia* que apresenta ampla distribuição na região Neotropical e que no passado foi tido como um dos gêneros mais especiosos dentro de Siluriformes pode ser considerado um dos grandes dilemas da taxonomia moderna, a qual não chegou a um consenso sobre o número real de espécies que o compõe. A revisão proposta por Silfvergrip (1996) para o gênero divide os taxonomistas, uma vez que para muitos destes pesquisadores esse trabalho resultou em uma subestimativa do número de espécies de *Rhamdia* existentes.

Anteriormente à realização desta tese, inúmeros estudos citogenéticos e dados de sequenciamento de genes mitocondriais das espécies de *Rhamdia* encontradas na América Central, já forneciam fortes indícios de que a proposta taxonômica de Silfvergrip (1996) era problemática em diversos aspectos, sendo que a principal falha deste trabalho envolve a espécie mais comum e amplamente distribuída do gênero, *R. quelen*.

Quando associadas as informações citogenéticas e moleculares obtidas no presente estudo chegou-se as seguintes conclusões:

- O gênero *Rhamdia* não é monofilético, uma vez que amostras de *R. itacaiunas* e *R. quelen* apresentaram maior proximidade genética com espécies de outros gêneros da família Heptapteridae, do que com outras espécies de *Rhamdia*.

- O que atualmente é reconhecido como *R. quelen*, trata-se na verdade de um complexo de espécies, o qual, aparentemente não pode ser identificado apenas com base em dados morfológicos, uma vez que não há caracteres diagnósticos que permitam sua diferenciação.
- Foram encontrados 14 clados para a América do Sul, suportados por altos valores de índice de Bremer e *bootstrap*. Estes clados foram considerados como unidades evolutivas válidas e a muitos deles foram atribuídos nomes de espécies de *Rhamdia* que foram sinonimizadas por Silfvergrip (1996) em *R. quelen*. Este fato indica que algumas espécies do gênero precisariam ser revalidadas, enquanto outras precisariam ser descritas.
- Dentro dos 15 grupos de espécies encontrados para a América do Sul, observa-se que estas geralmente estão presentes em uma única bacia hidrográfica, embora cada bacia possa abrigar mais de uma forma de *Rhamdia*, como é o caso das bacias dos rios Paraná, Paraíba do Sul e Amazônica. Observa-se também que as populações de uma mesma espécie apresentam uma estruturação filogeográfica e pouca ou nenhuma diferenciação genética entre si.
- As análises citogenéticas realizadas no presente trabalho foram centradas em *R. quelen* pois esta foi a classificação atribuída pelos taxonomistas. Porém, com base nos dados moleculares obtidos, pelo menos um representante dos grupos “*branerii*”, “*cuprea*”, “*enfurnada*”, “*hilarii*”, “*paraiba*”, “*paranapanema*” e “*sebae*” foi estudado do ponto de vista cromossômico. Desta forma observa-se que uma série de características citogenéticas são compartilhadas pelas espécies do gênero *Rhamdia*, como: número cromossômico, padrão de bandamento C do complemento cromossômico padrão, número e localização dos genes ribossomais 5S e 18S,

natureza CG rica das RONS e a presença de cromossomos supranumerários. O fato de estas características cromossômicas mostrarem-se conservadas poderia ser explicado pela ancestralidade compartilhada pelo grupo.

- O fato de populações de espécies diferentes compartilharem o mesmo padrão cariotípico pode ser resultado de convergência genética ou manutenção do cariótipo ancestral.
- Os cromossomos supranumerários estão presentes em pelo menos uma população de cada uma das espécies estudadas. Se estes dados forem inseridos nas topologias das árvores filogenéticas obtidas, observa-se que mesmo clados que apresentam elevada divergência genética apresentam estes cromossomos, o que seria um forte indício de que estes cromossomos extras possuem uma origem comum, de forma que estes poderiam ser considerados como uma sinapomorfia do grupo, uma vez que a presença destes cromossomos é marcante no gênero, e situação semelhante não é observada em outros grupos de Heptapteridae onde a ocorrência de supranumerários é um evento ocasional.
- Diferentes populações e espécies de *Rhamdia* apresentam diferenças no número, tamanho e padrão de bandamento C dos cromossomos supranumerários. Esta situação é observada mesmo entre populações que apresentam a mesma fórmula cariotípica, indicando que estes cromossomos, apesar de uma origem comum, passaram por processos de evolução independentes que resultaram em sua diferenciação.
- Aparentemente os cromossomos supranumerários de *Rhamdia* evoluíram a partir de um evento de não-disjunção que envolveu um cromossomo metacêntrico médio do complemento A que apresentava ambas as regiões terminais dos braços

cromossômicos heterocromáticas. Após este evento os cromossomos supranumerários seguiram caminhos evolutivos diferenciados e sofreram modificações que levaram a perda de regiões eucromáticas ou heterocromáticas, resultando nos tipos de supranumerários observados atualmente.

- Cada vez mais estudos que utilizam uma abordagem mais abrangente, combinando dados biológicos de diferentes naturezas, como bioquímica, ecologia, genética, morfologia, entre outros, mostram-se mais efetivos na determinação das relações evolutivas. No caso do gênero *Rhamdia*, os dados obtidos no presente trabalho mostram que a utilização de ferramentas morfológicas para a delimitação de espécies apresenta muitas limitações, demonstrando que a proposta de Silfvergrip (1996) precisa ser revista e que esta nova revisão deve levar em conta os dados genéticos. Desta forma, pode-se concluir que esta abordagem de diferentes frentes associadas na caracterização dos grupos de peixes pode contribuir para um melhor delineamento da história evolutiva dos peixes neotropicais, principalmente em grupos que apresentam taxonomia complexa envolvendo padrões morfológicos altamente conservados e grupos com grande distribuição geográfica.



*Referências
Bibliográficas*

Referências Bibliográficas

- Abucarma M, Martins-Santos IC (2001). Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguazu Basin. *Cytologia* 66(3): 299-306.
- Agapow PM (2004). The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. *Quartely Review Biol* 79(2): 161-179.
- 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 FS, Sodr e LMK, Contel EPB (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet e e Paranapanema Rivers. *Genet Mol Biol* 26(3): 301-305.
- Almeida-Toledo LF, Garcia C (2008). Análises cromossômicas comparativas em espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): ocorrência de cromossomos sexuais e polimorfismos estruturais e numéricos. *Anais XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*. Universidade Federal de Uberl ncia. Uberlândia – MG.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, Toledo Filho SA (1992). Cytogenetic analysis of the Brazilian catfish *Pimelodella kronei* and it presumed ancestor *P. transitoria*. *Caryologia* 45(3-4): 255-262.
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 97: 229-233.
- Alves AL, Torres TT, Azeredo-Espin AM, Reis SF, Oliveira C (2006). Isolamento e caracteriza o de marcadores microssatélites no jundi a, *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). *Anais do XI Simpósio internacional de citogenética e genética de peixes*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- SP, Brasil.
- Alves-Gomes JA, Ortí G, Haygood M, Heiligenberg W, 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.
- Andrade SF, Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (1998). Caracteriza o cromossômica da espécie *Rhamdia sp.* (Pisces, Pimelodidae), proveniente do Rio Sapucaia, Represa de Furnas, MG. *Anais do 44  Congresso Nacional de Genética,  guas de Lindóia, São Paulo, Brasil*.

- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1993). Chromosome studies in Hypoptomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II ZZ/ZW sex-chromosome system, B-chromosomes and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. Cytogenet Cell Genet 63: 215-220.
- Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R (2003) Catfishes. 2 vol., Phmouh: Science Publischers, 844p.
- Artoni RF, Bertollo LAC (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). Hereditas 134: 201-210.
- Artoni RF, Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. Heredity 89: 15-19.
- Avise JC (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. Phill. Trans Roy Soc London 312: 325-342.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Cabello PH, Traub-Cseko M (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. Aquaculture 247(1-4): 51-65.
- Beheregaray LB, 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 LB, Ciofi C, Caccone A, Gibbs JP, Powell JR (2003). Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzón, Galápagos Islands. Conserv Genet 4: 31-46.
- Bermingham E, Avise JC (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. Genetics 113: 939-965.
- Bermingham E, Martin AP (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.
- Betancur-R R, Acero, AP, Bermingham E, Cooke R (2007) Systematics and biogeography of the New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. Mol Phylogenet Evol 45: 339-357.
- Bichuette ME, Trajano E (2005). A new cave species of *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) from Serra do Ramalho, northeastern Brazil, with notes on ecology and behavior. Neotrop Ichthiol 3(4):587-595.

Bleker P (1858). *Ichthyologiase archipelagi Indici Batavaia*. 370pp.

Bockmann FA (1994) Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodidae catfish from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes, Pimelodidae). *Proc Biol Soc Wash* 107: 760-777.

Bockmann FA (2007) Família Heptapteridae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS, (eds.) *Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 104-109pp.

Bockmann FA (1998) Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 599p.

Bockmann FA, Guazzelli GM (2003). Heptapteridae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ, (eds) *Check list of freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 406-431pp.

Bockmann FA, Miquelarena AM (2008). Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa* 1780: 1-54.

Boore JL (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucl Acids Res* 27: 1767-1780.

Borin LA, Martins-Santos IC (2000). Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguazu River basin in Brazil. *Genet Mol Biol* 23, 3, 605-607.

Borin LA, Martins-Santos IC (2002). Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. *Cytologia* 67: 199-204.

Borin LA, Martins-Santos IC (2004). Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), from river Iguazu. *Hereditas* 140: 201-209.

Borin LA, Martins-Santos IC (1997). Caracterização cariotípica de duas espécies de *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae) da bacia do rio Iguazu. *Rev Brasil Genet* 20: 97.

Born GG, Bertollo LAC (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.

Brito MR, (2003) Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophys) Tese de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

Britski HA (1981). Peixes de água doce. In: Carvalho, J.C.M. (Coord.) Atlas da fauna brasileira. Melhoramentos, São Paulo, SP, 84-93 pp.

Britski HA, Sato Y, Rosa ABS (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3ª ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação - CODEVASF 115p.

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

Camacho JPM (1993). Polymorfisms and geographic distribution. Anais First B-chromosome Conference. Universidade Autonoma de Madri, Madri, Espanha, 2-4 pp.

Carvalho RA, Dias AL (2001) Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) provenientes da Bacia do Rio Tibagi/PR. Resumos do Congresso Nacional de Ictiologia.

Carvalho RA, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2004) Cytogenetic analysis of A and B-chromosomes of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river, Paraná, Brazil. *Cytologia* 69: 381-385.

Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL. (2008) B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater neotropical fishes (Teleostei). *J Fish Biol* 72: 1907-1932.

CastroMR, Casatti L, Santos HF, Vari RP, Melo ALA (2005). Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol Explor Freshwaters* 69(3): 193-214.

Centofante L, Bertollo, LAC, Moreira-Filho O (2006). Cytogenetic characterization and description of an XX/XY sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet. Genome Res* 112: 320-324.

CEPEN - Centro de Pesquisas Eco-Naturais (2005) www.cepen.com.br/pesc_jundia.htm

- Cerealli SS, Pomini E, Rosa R, Zawadzki CH, Froehlich O, Giulinao-Caetano L (2008). Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genet Mol Res* 7 (3): 583-591.
- Cestari MM, Galetti Jr. PM (1992). Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, pisces). *Brazil J Genet* 15(3): 555-567.
- Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Mol Phylogenet Evol* 49: 606-617.
- Cuvier G, Valenciennes A (1840). *Histoire naturelle des poissons*. Tome quinzieme. Paris +540pp.
- Dantas ESO, Vicari MR, Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF (2007) - Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). *Nucleus* 50:505-518.
- Dias AL, Foresti F (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev Brasil Genet* 16: 585-600.
- Diogo R (2003) Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. In: Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R,(eds) *Catfishes*. London, Science publishers, 353-384pp.
- Doyle JJ (1992). Gene trees and species trees: molecular systematics as a one-character taxonomy. *Syst Bot* 17: 144-163.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC (1992). Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Brazil J Genet* 15(2): 369-383.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fenocchio AS (1993). Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces). Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193- 198.

- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JPM (2000). B chromosomes in two fish species genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biol. (Kraków)* 48: 105-109.
- Fenocchio AS, Swarça AC, Dias AL, Cestari MM (2002). Caracterização cromossômica (Giemsa, Bandas C, NORs, CMA3 e FISH) de *Rhamdia quelen* do Alto Rio Iguaçu (Estado do Paraná). Anais do IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Dias, A.L. e Swarça, A.C. (2003) Cytogenetic studies and correlations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, 68(4): 363-368
- Ferraris Jr CJ (1988). Relationships of the neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthyes: Siluriformes: Pimelodidae). *Proc Biol Soc Wash* 101: 509-516.
- Ferraris Jr CJ (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.
- Fink SV, Fink WL (1996) Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD, (eds) Interrelationships of fishes. San Diego, Academic Press, 209-249pp.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Pope L, Prince R (1997). Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147: 1843-1854.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet* 31: 137-144.
- Fowler HW (1950). Os peixes de água doce do Brasil. *Act Arq Zool São Paulo* 6:568-579.
- Funk DJ, Omland KE (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. PM, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1984). Karyotypic similarity in three species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia* 37(4): 401-406.
- Garcia C (2005). Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de cinco famílias de Siluriformes do rio São Francisco. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

- Garcia C, Moreira-Filho O(2005). Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology* 3: 285-290
- Garcia C, Moreira-Filho O (2008). Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco river: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA site. *Genetics and Molecular Biology*. 31: 261-264.
- Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L (2003). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 64(4): 403-411.
- Garesse R, Carrodeguas JA, Santiago J, Perez ML, Marco R, Vallej CG (1997) *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comp Biochem Phisiol* 117: 357-366.
- Gold JR, LiC, Shipley NS, Powers PK (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of methapase chromosome banding. *J Fish Biol* 37: 563-575.
- Guilherme LC (2005). Estudos reprodutivos, citogenéticos na população de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) do rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia –MG, Brasil.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hanseman JD (1911). Some new species of fishes from the Rio Iguassu. *Annals of Carnegie Museum* 7: 374-387.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S RNA genes in the fish *Prochilodus argentus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Hardman M (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombinaton activating gene 2. *Mol Phylogenet Evol* 30: 395-408.
- Hardman M (2005). The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes).
- Hardman M, Page LM (2003) Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes, Ictaluridae). *Copeia* 1: 20-33.

- Hardman M, Lundberg JG (2006) Molecular phylogeny and chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Mol Phylogenet Evol* 40: 410-418.
- Hills DM (1987) Molecular versus morphological approaches to systematic. *Ann Rev Ecol System* 18: 23-42.
- Hochberg VBM, Erdtmann B (1988) Cytogenetical and morphological considerations of *Rhamdia quelem* (Pisces, Pimelodidae) – the occurrence of B chromosomes and polymorphical NOR regions. *Rev Brasil Genet* 11(3): 563-576.
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hrbek T, Farias IP, Crossa M, Sampaio I, Porto JIR, 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.
- Jesus CM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1999). Comparative cytogenetics of *Apareidon affinis* (pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. *Genetica* 105: 63-67.
- Jones RN, Rees H (1982). B chromosomes. London: Academic Press.
- Kavalco KF (2008). Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kavalco KF, Almeida-Toledo LF (2007). Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4: 103-111.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004a). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94: 180-186.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004b). Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas* 141: 237-242.
- Kobmüller S, Sturmbauer C, Verheyen E, Meyer A, Salzburger W (2006) Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes, *Synodontis*). *BMC Evol Biol* 16:49.

- Kubota H, Doi T, Yamamoto S, Watanabe S (2007). Genetic identification of native populations of fluvial white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* in the upper Tone River drainage. *Fisherie Science* 73: 270-284.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Li FB, Gui JF (2007). Clonal diversity and genealogical relationships of gibel carp in four hatcheries. *Animal Genet* 39: 28-33.
- Li M, Wei F, Goossens B, Feng Z, Tamate HB, Bruford MW, Funk SM (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, Jin X, i Yokogawa K, 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 Phylogenetete evol* 39: 799-811.
- Lowe-McConeel (1975) *Fish communities in tropical freshwaters – Their distribution, ecology and evolution*. Longman London, 337p.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba MCLS, Wesselingh F (1998). The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS, (eds) *Phylogeny and Classifications of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 13-48pp.
- Lundberg JG, Friel JP (2003). Siluriformes. Catfishes. Version 20 January 2003 (under construction). <http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Lundberg JG, Bornbusch AH, Mago-Leccia F (1991a). *Gladioganis conquistador* s. sp., from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n subf. (Siluriformes, Pimelodidae). *Copeia*, 1991:190-209.
- Lundberg JG, Mago-Leccia F, Nass P (1991b). *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from deep river channels of South America, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proc Biol Soc Wash* 104: 840-869.

- Mabuchi K, Miya M, Satoh TP, Westneat MW, 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.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2002). Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, silver nitrate and Cma₃ staining and Restriction Endonuclease banding. Cytologia 67: 25-31.
- Margarido VP, Moreira-Filho O (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). Genet Mol Biol 31(1): 235-238.
- Marques MBA, Moreira Filho O, Garcia C, Margarido VP (2008). Cytogenetical analyses of two endemic fish species from the São Francisco river basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). Genetics and Molecular Biology, 31: 215-221.
- Martin AP, Bermingham E (2000). Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of neotropical catfish. Proc R Soc Lond 267:1135-1141.
- Martinez ERM, Nirchio M, Granado A, Foresti F, Oliveira C (2008a). Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes). Genet Mol Biol 31: 692-696.
- Martinez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Moreira-Filho O (2008b) Análise citogenética de uma população de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) do Ribeirão dos Negros –SP. Anais XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chrom Res 7: 363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. Chrom Res 8: 353-355.
- Martins C, Wasko AP (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in fish genome. In: Focus on Genome Research (Ed. C.R. Williams). Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 289-318 pp.
- Martins C, Vênere PC, Mestriner CA, Cestari MM, Ferreira P, Galetti Jr. PM (2000). Chromosome relationship between Anostomidae e Chilodontidae fish (Characiformes). Cytologia 65: 153-160.

- Mattox GMT, Bichuette ME, Secutti S, Trajano E. (2008). Surface and subterranean ichthyofauna in the Serra do Ramalho karst area, northeastern Brazil, with updated lists of Brazilian troglobitic and troglophilic fishes. *Biota Neotrop* 8(4): 145-152.
- Mayr B, Kalat M, Rab P (1985). Localization of NORs and countersaturn-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica* 67: 51-56.
- Mees GF (1974). Auchenipteridae and Pimelodidae. *Zool. Verh.* 132: 115-246.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini S, Ruiz IGR, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9.
- Meyer A (1994). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Beaumont.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, 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.
- Moeser AA, Bermingham E (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). *Mol Ecol* 5: 323-325.
- Montoya-Burgos JI (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with implications on the diversification of neotropical ichthyofauna. *Mol Ecol* 12: 1855-1867
- Moraes VPO, Cereali SS, Froehlich O, Dias AL (2007). Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genet Mol Res* 6(3): 627-633.
- Morán, P.; Martínez, J.L.; García-Vázquez, E. e Pendás, A.M. (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout. *Cytogenet Cell Genet* 75: 145-150.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM (1984) Structure and variability of nucleolar organizing regions in Paradontidae fish. *Canad J Genet Cytol* 26(5): 564-568.
- Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC (2004) B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res* 106: 230-234.

- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Ecol Syst.*18: 269-292.
- Moyer GR, Burr BM, Krajewski C (2004). Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool J Linnean Society* 140: 551-575.
- Moysés CB (2005). Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moysés CB, Almeida-Toledo LF (2002). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 25(4): 401-407.
- Nelson SJ (2006). *Fishes of the world*. 4 th. Ed. United States of America. John Wiley & Sons. 600p.
- Neo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 108 : 211-215.
- Oliveira C (2003). Lista de peixes Neotropicais de Água doce. http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/lab_pesq_biolgia_e_genetica_de_peixes.php.
- Oliveira C, Gosztanyi AE (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriforms. *Caryologia* 53(1): 31-37.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Toledo SA, Foresti F (1988). Supernumerary chromosome, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 21: 227-236.
- Oliveira JC, Britski HA (2000). Redescritção de *Taunayia bifasciata* (Eigenmann e Noriis, 1990), um bagre enigmático do Estado de São Paulo (Siluriformes, Pimelodidae, Heptapterinae). *Pap. Avulsos de Zool* 41: 119-133.
- Orbacz EA, Gaffney PM (2000). Genetic structure of tautog (*Tautoga onitis*) populations assayed by RFLP and DGGE analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Fish. Bull.* 98:336-344.
- Ortí G, Petry P, Porto JIR, Jégu M, Meyer A (1996). Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol Evol* 42: 169-182.

- Passarge E (1995). Color atlas of genetics. Thieme Medical Publishers. New York.
- Pelegriño KC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Sites JR, JW (2001). A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae) and a new classification to the family. *Biol J Linnean Soc* 74: 315-338.
- Pendás AM, Morán P, Freije JP, Garcia-Vazquez E (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet* 67: 31-36.
- Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. *Mol Phylogenet Evol* 25:172-189.
- Pereira SL, Baker AJ, Wajntal A (2002). Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). *Syst Biol* 51 (6): 946-958.
- de Pinna MCC (1993). Higher-Level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi). Tese de doutorado, The City University of New York, New York.
- de Pinna MCC (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba, LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Edpurcs, Porto Alegre - Brasil, 279-330pp.
- de Pinna MCC, Vari RP (1995). Monophyly and phylogenetic diagnosis of the family Cetopsidae, with synonymization of the Helogenidae (Teleostei: Siluriformes). *Smithson Contribu Zool* 57: 1-26.
- de Pinna MCC, Ferraris C, Vari RP (2007). A phylogenetic study of the neotropical catfish family Cetopsidae (Osteichthyes, Ostariophysi, Siluriformes), with a new classification. *Zool J Linnean Soc* 150: 755-813.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW.(1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sc.* 83: 2934-2938.
- Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 917-818.
- Pretti VQ, Calcagnotto D, Toledo-Piza M, Almeida-Toledo LF (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* (no prelo).

Prioli SMA, Prioli AJ, Julio Jr. HF, Pavanelli CS, Oliveira AV, Carrer H, Carraro DM, Prioli RM (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet Mol Biol* 25(4): 421-430.

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

Reed KM, Dorschener M, Phillips RB (1997) Characteristics of two salmonid repetitive DNA families in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Cytogenet Cell Genet* 79: 187-187.

Reis RE (2003). Família Callichthyidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ, (eds) Check list of freshwater fishes of South America. *Edipurcs* 291-309.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ (2003). Check list of the freshwater fishes of the South and Central America. *Edipurcs*, 742p.

Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop Ichthyol* 4: 225-246.

Ribolli J, Melo CMR, Zaniboni Filho E (2008). Diversidade genética do jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) da bacia do alto rio Uruguai, Brasil. *Anais XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia - MG.

Roman MP, Pregararo JL, Margarido VP (2001). Análises citogenéticas em quatro espécies de siluriformes (Pisces), com ênfase ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. *Anais do 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil*.

Roman MP, Moreira-Filho OM, Margarido VP (2002). O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguazu e um caso de triploidia natural. *Anais do IX Simpósio de citogenética e genética de Peixes*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

Romero A, Paulson KM (2001). It's a Wonderful Hypogean Life: A Guide to the Troglomorphic Fishes of the World. *Environment Biol Fish* 62: 13-48.

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

- Salhi M, Bessonart M, Chediak G, Bellagamba M, Carnevia D (2004). Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture* 231: 435-444.
- Salvador B, Moreira-Filho O (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69 : 50-56.
- Sanetra M, Crozier RH (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.
- Schimid M (1980) Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC and AT rich chromosomes regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Silfvergrip AMC (1996). A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm University, Swedish Museum of Natural History. Stockholm, 156p.
- Silva MJ, Yonenaga-Yassuda Y (2004). B chromosomes in brazilian rodents. *Cytogenete Genome Res* 106:257-263.
- Silva M, Camargo EF, Almeida MC, Ludwi LAM (2008). Monitoramento citogenético aplicado ao repovoamento de *Rhamdia* (Siluriformes, Heptapteridae) do rio Iguaçú.
- Sivansudar A, Bermingham E, Ortí G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in the major South American Rivers. *Mol Ecol* 10: 407-417.
- Shimabukuro-Dias CK, Oliveira, C, Reis RE, Foresti F (2004). Molecular phylogeny of the armoured catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol Phylogenet Evol* 32: 152-163.
- Sorenson MD (1999) TreeRot, version 2. Boston University, Boston MA.
- Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2004) Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from Parana river basin of Brazil. *Folia Biol (Kraków)* 52(3-4): 165-169.
- Sterba G (1973). *Freshwater fishes of the world*. T.F.H. Publications, USA, Vol I e II, 887 p.
- Stivari MK, Martin-Santos IC (2004). Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). *Cytologia* 69: 25-34.

- Steindachner F (1876). Die Susswasserfische des sudostlichen Brasilien (III). Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen class der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Win 74: 1-136.
- Sullivan JP, Lundberg JG, Hardman M (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei, Siluriformes) using *rag 1* and *rag 2* nuclear gene sequences. Mol Phylogenet Evol 41: 636-662.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell 75: 304-306.
- Swarça AC, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2000). Cytogenetics of species of the families Pimelodidae e Rhamdiidae (Siluriformes). Genet Mol Biol 23:589-593.
- Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL (2003) Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish specie (Pimelodidae, Siluriformes). Genetica 119: 87-92.
- Swofford DL (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Szymura JM, Spolsky C, 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, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and g + c- content biases. Mol Biol Evol 9: 678-687.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibbons TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680.
- Toledo V, Ferrari I (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella Sp.* e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): Cromossomo marcador. Científica 4: 120-123.
- Trajano E (2000). Cave Faunas in the Atlantic Tropical Rain Forest: Composition, Ecology, and conservation. Biotropica 32(4b): 882-893.
- Trajano E (2003). Ecology and ethology of subterranean catfishes. In: Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R (eds.) Catfishes. Science Publishers, Enfield, 601-635 p.

- Trajano E, HA Britski (1992). *Pimelodella kronei* (Ribeiro,1907) e seu sinônimo *Caecorhamdella brasiliensis* Borodin, 1927: morfologia externa, taxonomia e evolução (Teleostomi, Siluriformes). Boletim Zool 12: 53-89.
- Trajano E, Reis RE, Bichuette ME (2004). *Pimelodella spelaea*, a new cave catfish from Central Brazil, with data on ecology and evolutionary considerations (Siluriformes: Heptapteridae). Copeia (2): 315-325.
- Varcacel A, Brunner P, Maggese MC (1993). B Chromosome polymorphism in South America catfish *Rhamdia sapo*. Aquaculture 110: 111-118.
- Vari RP, Malabarba LR (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena, ZMS, Lucena, CAS (eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 1-11 pp.
- Vasconcelos C, Martins-Santos I. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). Hereditas 132: 103-109.
- Vergara J, Azpelicueta MM, Garcia G (2008). Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. Neotrop Ichthyol 6:75-85.
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). Cytogenet Genome Res 74:70-75.
- Vicente VE, Jesus CM, Moreira Filho O (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Paradon* species (Pisces, Paradontidae). Caryologia 4: 365-369.
- Vissoto PC, Foresti F, Oliveira C (1999). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). Chromosome Science 3: 9-13.
- Xia X, Xei Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J Heredity 92: 371-373.



Anexos

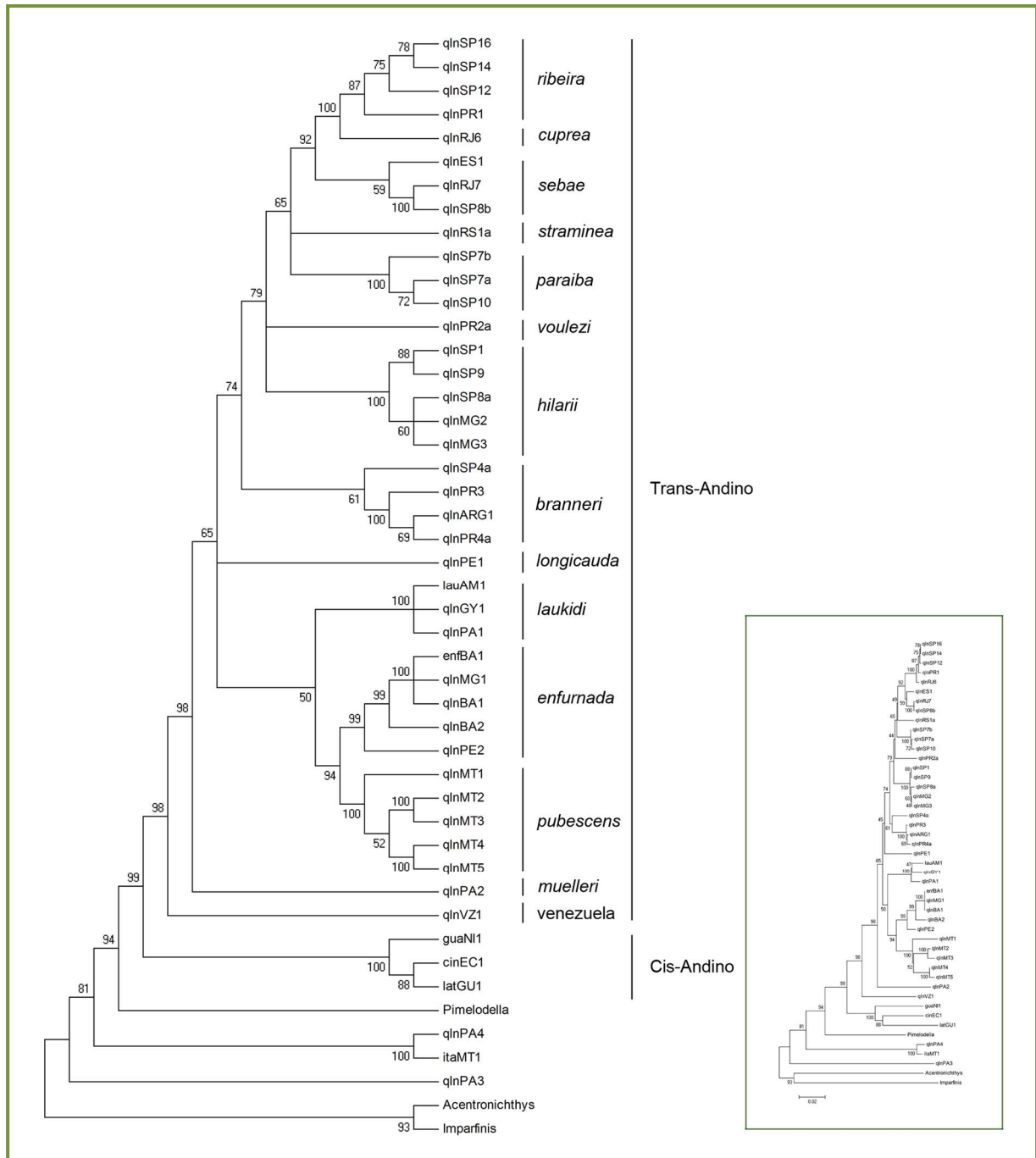


Figura 5.1: Topologia de Neighbor-Joining obtida para a análise parcial dos dados utilizando todas as regiões gênicas concatenadas. Os valores de *bootstrap* para 1000 replicações encontram-se acima dos ramos. Em detalhe Topologia de Neighbor-Joining obtida para todas as regiões gênicas concatenadas. Árvore em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a filogenia, assumindo taxas evolutivas iguais para todas as linhagens. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos).

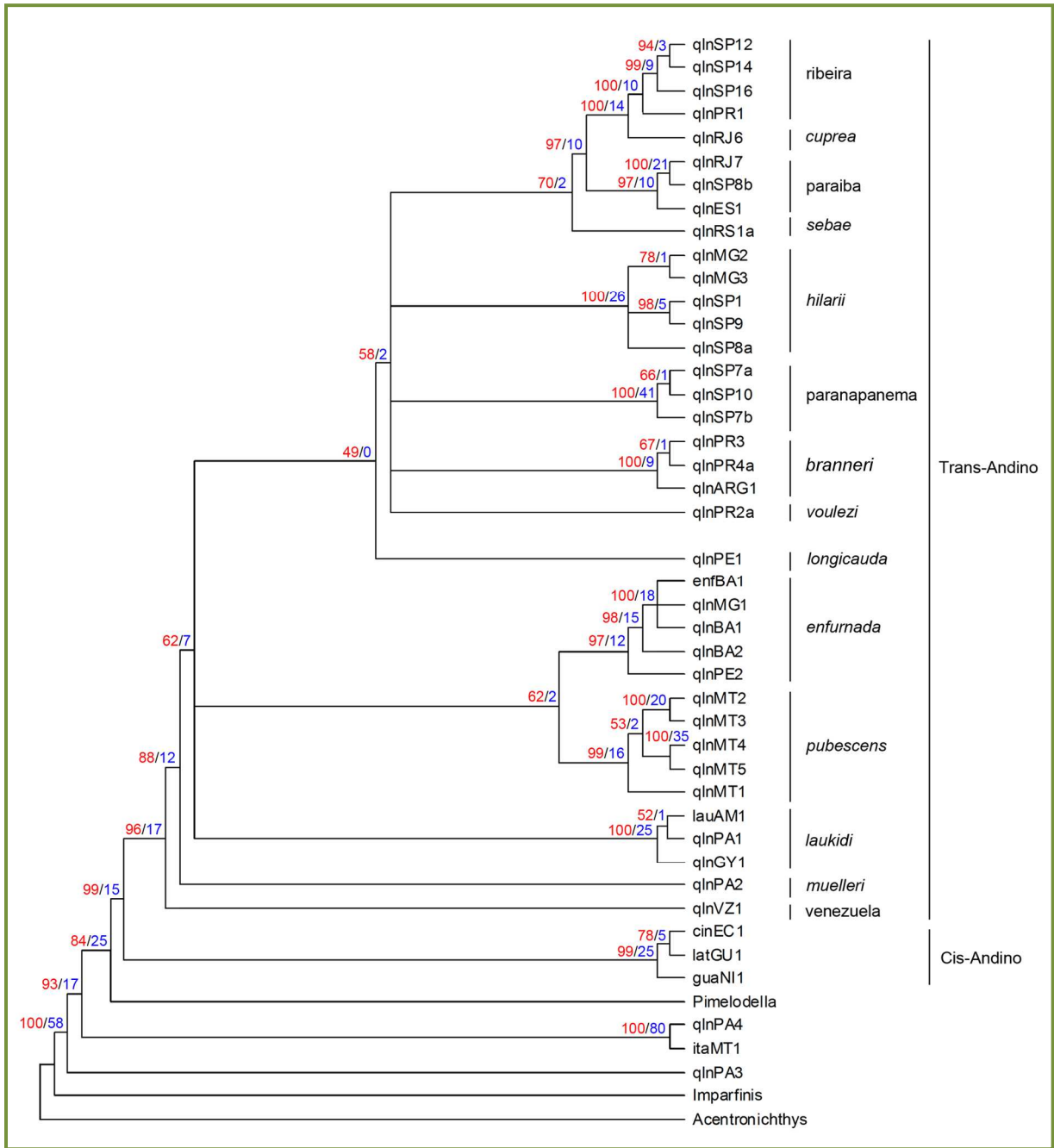


Figura 5.2: Reconstrução filogenética a partir do método de Máxima Parcimônia para a análise parcial dos dados com base nas sequências concatenadas das regiões mitocondriais estudadas. Árvore consenso das seis árvores mais parcimoniosas obtidas. Os valores em vermelho correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicações, e os valores em azul aos valores de índice de Bremer. As siglas dos exemplares e localidades encontram-se listadas na Tabela 3 (Materiais e Métodos).

Anexo II

Divergência nucleotídica

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Acentroni	-							
2 cinEC1	0.19584	-						
3 enfBA1	0.22515	0.10175	-					
4 guaNI1	0.18454	0.06559	0.09653	-				
5 Imparfini	0.18463	0.20061	0.23032	0.19673	-			
6 itaMT1	0.19712	0.15818	0.15918	0.15479	0.19368	-		
7 latGU1	0.19921	0.06817	0.10748	0.07588	0.19357	0.16370	-	
8 lauAM1	0.22444	0.10099	0.05295	0.09711	0.23385	0.16225	0.11205	-
9 Pimelodel	0.23567	0.12943	0.18151	0.13028	0.24432	0.14324	0.14341	0.19155
10 qlnARG1	0.18393	0.10032	0.05305	0.09518	0.19215	0.15014	0.10675	0.05226
11 qlnBA1	0.22445	0.10175	0.00102	0.09653	0.22927	0.15974	0.10748	0.05295
12 qlnBA2	0.22587	0.10268	0.01744	0.09742	0.23174	0.16383	0.11099	0.05440
13 qlnES1	0.21882	0.09633	0.05922	0.09760	0.22441	0.14923	0.10404	0.06290
14 qlnGY1	0.18547	0.10547	0.04311	0.09582	0.20254	0.15638	0.10868	0.01723
15 qlnMG1	0.22500	0.10179	0.00102	0.09656	0.23089	0.15921	0.10752	0.05330
16 qlnMG2	0.21869	0.09828	0.05158	0.09899	0.22567	0.15594	0.10809	0.05292
17 qlnMG3	0.22074	0.09828	0.05361	0.09900	0.22666	0.15599	0.10810	0.05567
18 qlnMT1	0.22953	0.10705	0.04899	0.09560	0.23501	0.16026	0.10972	0.06033
19 qlnMT2	0.22200	0.09935	0.04923	0.09425	0.22790	0.15882	0.10454	0.05877

20	qlnMT3	0.18654	0.10092	0.04656	0.09719	0.19587	0.15820	0.10739	0.06271
21	qlnMT4	0.22592	0.10929	0.05078	0.10523	0.23196	0.15812	0.11268	0.05990
22	qlnMT5	0.22642	0.11253	0.05397	0.10738	0.23303	0.16068	0.11638	0.06417
23	qlnPA1	0.22239	0.10247	0.04683	0.09851	0.23038	0.15871	0.11156	0.01841
24	qlnPA2	0.23017	0.11097	0.06875	0.11223	0.23433	0.16411	0.12128	0.07021
25	qlnPA3	0.22661	0.19259	0.19658	0.18870	0.21976	0.18297	0.19526	0.19907
26	qlnPA4	0.19801	0.16136	0.15783	0.15879	0.19567	0.00814	0.16272	0.16266
27	qlnPE1	0.18578	0.09968	0.04717	0.09389	0.19643	0.15080	0.10547	0.05415
28	qlnPE2	0.22158	0.10443	0.03114	0.09791	0.23066	0.15965	0.10951	0.05573
29	qlnPR1	0.22538	0.09935	0.06331	0.10383	0.23023	0.15153	0.11094	0.06667
30	qlnPR2a	0.22259	0.09878	0.05538	0.10122	0.22291	0.15918	0.10513	0.05736
31	qlnPR2b	0.22409	0.09761	0.05332	0.10005	0.22303	0.15779	0.10398	0.05501
32	qlnPR3	0.22158	0.09859	0.05499	0.09337	0.22679	0.15394	0.10497	0.05594
33	qlnPR4a	0.22361	0.10054	0.05670	0.09531	0.22847	0.15497	0.10691	0.05731
34	qlnPR4b	0.22326	0.09992	0.05636	0.09469	0.22882	0.15496	0.10629	0.05697
35	qlnRJ1	0.22214	0.09566	0.05748	0.10012	0.22525	0.15022	0.10725	0.06120
36	qlnRJ2	0.21973	0.09437	0.05643	0.09884	0.22461	0.14921	0.10595	0.05980
37	qlnRJ3	0.22250	0.09561	0.05746	0.10007	0.22561	0.15068	0.10720	0.06150
38	qlnSP16	0.22066	0.09866	0.06363	0.10445	0.22659	0.15326	0.11156	0.06633
39	qlnRJ4	0.21670	0.09638	0.05774	0.09699	0.21462	0.15087	0.10282	0.05999
40	qlnRJ5	0.22250	0.09561	0.05746	0.10007	0.22561	0.15068	0.10720	0.06150
41	qlnRJ6	0.22268	0.09564	0.05715	0.10011	0.22580	0.15022	0.10723	0.06122
42	qlnRJ7	0.22330	0.09620	0.06058	0.09679	0.22501	0.15075	0.10265	0.06223
43	qlnRS1a	0.22180	0.09577	0.05952	0.09700	0.22598	0.15288	0.10478	0.06184

44	qlnRS1b	0.22110	0.09513	0.05781	0.09635	0.22634	0.15235	0.10414	0.06082
45	qlnSP1	0.22045	0.09829	0.05294	0.09894	0.22638	0.15687	0.10936	0.05395
46	qlnSP2	0.21837	0.09899	0.05226	0.09839	0.22607	0.15704	0.11006	0.05361
47	qlnSP3	0.18054	0.10239	0.05335	0.10315	0.19729	0.15724	0.11208	0.05354
48	qlnSP4a	0.21595	0.09855	0.05120	0.09210	0.22395	0.15507	0.10505	0.05253
49	qlnSP4b	0.21630	0.09920	0.05154	0.09274	0.22431	0.15560	0.10569	0.05287
50	qlnSP5	0.22344	0.09626	0.06287	0.09684	0.22514	0.15068	0.10270	0.06387
51	qlnSP6	0.21784	0.09701	0.06125	0.09760	0.21720	0.15132	0.10215	0.06409
52	qlnSP7a	0.22003	0.09718	0.06014	0.09771	0.22664	0.15677	0.10547	0.06286
53	qlnSP7b	0.21885	0.09587	0.05949	0.09641	0.22614	0.15637	0.10418	0.06219
54	qlnSP8a	0.21872	0.09905	0.05226	0.09970	0.22746	0.15701	0.11013	0.05463
55	qlnSP8b	0.22328	0.09622	0.06057	0.09681	0.22358	0.15064	0.10267	0.06120
56	qlnSP9	0.22011	0.09893	0.05362	0.09958	0.22674	0.15589	0.11001	0.05429
57	qlnSP10	0.21985	0.09664	0.05851	0.09718	0.22507	0.15837	0.10494	0.06191
58	qlnSP11	0.22243	0.09881	0.06197	0.09940	0.22273	0.15224	0.10525	0.06397
59	qlnSP12	0.22150	0.10058	0.06430	0.10373	0.22743	0.15167	0.11084	0.06838
60	qlnSP13	0.21789	0.09960	0.05233	0.09899	0.22555	0.15715	0.10940	0.05270
61	qlnSP14	0.22298	0.09937	0.06399	0.10384	0.22857	0.15117	0.11095	0.06769
62	qlnSP15	0.22122	0.09896	0.05398	0.09834	0.22822	0.15544	0.10819	0.05602
63	qlnVZ1	0.18962	0.10289	0.07539	0.09518	0.19657	0.15493	0.10740	0.08426

	9	10	11	12	13	14	15	16
9 Pimelodel	-							
10 qlnARG1	0.11925	-						
11 qlnBA1	0.18192	0.05304	-					
12 qlnBA2	0.18365	0.05517	0.01850	-				
13 qlnES1	0.18146	0.02473	0.05920	0.06092	-			
14 qlnGY1	0.12754	0.05145	0.04311	0.04901	0.05433	-		
15 qlnMG1	0.18153	0.05305	0.00205	0.01780	0.06054	0.04310	-	
16 qlnMG2	0.17958	0.03269	0.05156	0.05440	0.03689	0.04810	0.05294	-
17 qlnMG3	0.18083	0.03274	0.05327	0.05586	0.03932	0.04815	0.05368	0.00341
18 qlnMT1	0.18603	0.06231	0.05003	0.05235	0.06504	0.05866	0.04936	0.06171
19 qlnMT2	0.18510	0.05968	0.04921	0.04767	0.06630	0.05424	0.05055	0.06110
20 qlnMT3	0.12673	0.06206	0.04657	0.04920	0.06060	0.05902	0.04657	0.06040
21 qlnMT4	0.18580	0.06140	0.05112	0.05170	0.06346	0.06097	0.05214	0.05984
22 qlnMT5	0.18794	0.06574	0.05430	0.05374	0.06633	0.06280	0.05493	0.06246
23 qlnPA1	0.18681	0.05065	0.04751	0.04696	0.05884	0.01489	0.04752	0.04951
24 qlnPA2	0.19885	0.05705	0.06978	0.07393	0.06809	0.06692	0.06841	0.06696
25 qlnPA3	0.22510	0.19372	0.19623	0.19802	0.19419	0.18410	0.19744	0.19540
26 qlnPA4	0.14783	0.15113	0.15835	0.16327	0.14967	0.15181	0.15786	0.15670
27 qlnPE1	0.12353	0.03023	0.04716	0.04934	0.03541	0.05338	0.04717	0.04205
28 qlnPE2	0.18348	0.04869	0.03215	0.02741	0.05995	0.04576	0.03250	0.05503
29 qlnPR1	0.18230	0.03245	0.06400	0.06704	0.03074	0.05639	0.06405	0.04547
30 qlnPR2a	0.17949	0.03146	0.05502	0.05865	0.04479	0.05203	0.05673	0.03823
31 qlnPR2b	0.17887	0.03021	0.05295	0.05768	0.04231	0.05077	0.05369	0.03765

32	qlnPR3	0.18311	0.00259	0.05566	0.05688	0.03796	0.05268	0.05601	0.03856
33	qlnPR4a	0.18471	0.00396	0.05704	0.05689	0.04036	0.05531	0.05740	0.04062
34	qlnPR4b	0.18432	0.00456	0.05670	0.05653	0.04002	0.05466	0.05705	0.04028
35	qlnRJ1	0.18158	0.03117	0.05748	0.06054	0.02631	0.05375	0.05753	0.03864
36	qlnRJ2	0.18077	0.02991	0.05675	0.06120	0.02593	0.05248	0.05778	0.03959
37	qlnRJ3	0.18156	0.03113	0.05812	0.06088	0.02628	0.05370	0.05817	0.03859
38	qlnSP16	0.18124	0.03296	0.06295	0.06732	0.02835	0.05685	0.06370	0.04478
39	qlnRJ4	0.18090	0.02798	0.05734	0.06081	0.01567	0.05054	0.05772	0.03790
40	qlnRJ5	0.18156	0.03113	0.05812	0.06088	0.02628	0.05370	0.05817	0.03859
41	qlnRJ6	0.18159	0.03116	0.05782	0.06055	0.02597	0.05374	0.05754	0.03830
42	qlnRJ7	0.18068	0.02789	0.06055	0.06411	0.01807	0.05045	0.06193	0.04305
43	qlnRS1a	0.18187	0.03000	0.06018	0.06266	0.03480	0.05317	0.06088	0.03618
44	qlnRS1b	0.18187	0.02935	0.05847	0.06088	0.03378	0.05251	0.05917	0.03516
45	qlnSP1	0.18117	0.03139	0.05258	0.05514	0.03930	0.04938	0.05398	0.00613
46	qlnSP2	0.18158	0.03339	0.05224	0.05511	0.03826	0.04881	0.05363	0.00511
47	qlnSP3	0.12538	0.03541	0.05337	0.05297	0.03321	0.05218	0.05336	0.00588
48	qlnSP4a	0.17844	0.02193	0.05051	0.05191	0.03795	0.04442	0.05158	0.03275
49	qlnSP4b	0.17884	0.02133	0.05086	0.05226	0.03761	0.04508	0.05192	0.03241
50	qlnSP5	0.18060	0.02790	0.06253	0.06520	0.01807	0.05046	0.06327	0.04234
51	qlnSP6	0.18129	0.02864	0.06086	0.06468	0.01775	0.05121	0.06124	0.04337
52	qlnSP7a	0.18260	0.02944	0.05980	0.06267	0.04203	0.05201	0.06022	0.03996
53	qlnSP7b	0.18083	0.02809	0.05915	0.06164	0.04138	0.05063	0.05851	0.03997
54	qlnSP8a	0.18117	0.03402	0.05293	0.05510	0.03929	0.05201	0.05363	0.00443
55	qlnSP8b	0.18070	0.02792	0.06055	0.06376	0.01977	0.05049	0.06194	0.03861

56	qlnSP9	0.17999	0.03205	0.05360	0.05546	0.03896	0.04872	0.05466	0.00647
57	qlnSP10	0.18163	0.03014	0.05817	0.06238	0.04105	0.05202	0.05858	0.03898
58	qlnSP11	0.18153	0.03052	0.06129	0.06460	0.02016	0.05375	0.06238	0.04209
59	qlnSP12	0.18319	0.03224	0.06428	0.06871	0.02833	0.05614	0.06470	0.04511
60	qlnSP13	0.18109	0.03267	0.05231	0.05553	0.03729	0.04808	0.05369	0.00478
61	qlnSP14	0.18205	0.03235	0.06397	0.06769	0.02833	0.05624	0.06435	0.04543
62	qlnSP15	0.18313	0.03290	0.05397	0.05752	0.04126	0.04975	0.05498	0.00789
63	qlnVZ1	0.12753	0.07588	0.07539	0.08012	0.07581	0.07653	0.07542	0.07533

		17	18	19	20	21	22	23	24
17	qlnMG3	-							
18	qlnMT1	0.06211	-						
19	qlnMT2	0.06254	0.03548	-					
20	qlnMT3	0.05949	0.03433	0.00627	-				
21	qlnMT4	0.06203	0.03658	0.02889	0.03122	-			
22	qlnMT5	0.06459	0.03976	0.03207	0.03364	0.00422	-		
23	qlnPA1	0.05190	0.05503	0.05536	0.05829	0.05745	0.06113	-	
24	qlnPA2	0.06806	0.07836	0.07251	0.06698	0.07546	0.07647	0.06920	-
25	qlnPA3	0.19680	0.19984	0.19002	0.18112	0.19148	0.19532	0.19563	0.20378
26	qlnPA4	0.15674	0.16264	0.15993	0.15971	0.15917	0.16064	0.15733	0.16589
27	qlnPE1	0.04209	0.05012	0.04868	0.04993	0.04905	0.05401	0.05387	0.06145
28	qlnPE2	0.05646	0.04727	0.03999	0.04331	0.04436	0.04578	0.04890	0.07374
29	qlnPR1	0.04718	0.06936	0.06878	0.06144	0.06704	0.07049	0.06226	0.07382

30	qlnPR2a	0.04066	0.06672	0.06458	0.06469	0.06517	0.06763	0.05363	0.07074
31	qlnPR2b	0.03981	0.06504	0.06250	0.06194	0.06256	0.06464	0.05257	0.06839
32	qlnPR3	0.03960	0.06245	0.06253	0.06170	0.06305	0.06693	0.05355	0.06557
33	qlnPR4a	0.04130	0.06389	0.06460	0.06468	0.06377	0.06763	0.05492	0.06804
34	qlnPR4b	0.04096	0.06353	0.06426	0.06417	0.06342	0.06729	0.05458	0.06839
35	qlnRJ1	0.04033	0.06538	0.06640	0.05995	0.06281	0.06570	0.05574	0.06742
36	qlnRJ2	0.04134	0.06462	0.06594	0.06039	0.06307	0.06595	0.05538	0.06669
37	qlnRJ3	0.04031	0.06573	0.06632	0.06044	0.06276	0.06565	0.05569	0.06740
38	qlnSP16	0.04647	0.06967	0.06880	0.06277	0.06673	0.06983	0.06293	0.07200
39	qlnRJ4	0.03944	0.06301	0.06631	0.06111	0.06416	0.06703	0.05743	0.07143
40	qlnRJ5	0.04031	0.06573	0.06632	0.06044	0.06276	0.06565	0.05569	0.06740
41	qlnRJ6	0.04001	0.06540	0.06675	0.05998	0.06279	0.06536	0.05541	0.06742
42	qlnRJ7	0.04446	0.06855	0.07042	0.06087	0.06768	0.07145	0.05954	0.07194
43	qlnRS1a	0.03859	0.06637	0.06422	0.05939	0.06449	0.06663	0.05878	0.06842
44	qlnRS1b	0.03757	0.06530	0.06251	0.05889	0.06415	0.06629	0.05708	0.06665
45	qlnSP1	0.00818	0.06174	0.06215	0.06036	0.06163	0.06521	0.05121	0.06839
46	qlnSP2	0.00716	0.06136	0.06111	0.06053	0.06091	0.06350	0.05121	0.06734
47	qlnSP3	0.00690	0.06193	0.06036	0.06199	0.05846	0.06225	0.04853	0.06320
48	qlnSP4a	0.03514	0.06035	0.05429	0.05516	0.05533	0.05806	0.05084	0.06484
49	qlnSP4b	0.03480	0.06000	0.05463	0.05567	0.05498	0.05772	0.05118	0.06449
50	qlnSP5	0.04371	0.07035	0.07038	0.06091	0.06804	0.07108	0.06046	0.07335
51	qlnSP6	0.04490	0.06758	0.07010	0.06211	0.06884	0.07156	0.06122	0.07406
52	qlnSP7a	0.04233	0.07135	0.06768	0.06032	0.06836	0.07073	0.05946	0.07157
53	qlnSP7b	0.04234	0.07035	0.06768	0.05929	0.06804	0.06903	0.05879	0.06986

54	qlnSP8a	0.00648	0.06242	0.06282	0.06190	0.06126	0.06419	0.05121	0.06802
55	qlnSP8b	0.04035	0.06856	0.06836	0.06094	0.06591	0.06940	0.05918	0.07234
56	qlnSP9	0.00852	0.06136	0.06283	0.05943	0.06127	0.06487	0.05189	0.06733
57	qlnSP10	0.04135	0.07145	0.06776	0.06086	0.06846	0.07014	0.05884	0.07026
58	qlnSP11	0.04378	0.06905	0.06882	0.06285	0.06708	0.06983	0.06126	0.07205
59	qlnSP12	0.04681	0.07176	0.07115	0.06123	0.06810	0.07082	0.06463	0.07340
60	qlnSP13	0.00683	0.06108	0.06050	0.05998	0.06100	0.06360	0.05097	0.06639
61	qlnSP14	0.04683	0.06967	0.07045	0.06079	0.06702	0.06977	0.06327	0.07201
62	qlnSP15	0.00859	0.06450	0.06359	0.06018	0.06295	0.06597	0.05261	0.06830
63	qlnVZ1	0.07534	0.08098	0.07631	0.07865	0.08120	0.08441	0.08059	0.07946

		25	26	27	28	29	30	31	32
25	qlnPA3	-							
26	qlnPA4	0.17837	-						
27	qlnPE1	0.18469	0.15174	-					
28	qlnPE2	0.19542	0.15878	0.03894	-				
29	qlnPR1	0.19918	0.15241	0.04551	0.06477	-			
30	qlnPR2a	0.19365	0.15912	0.04340	0.05916	0.04620	-		
31	qlnPR2b	0.19536	0.15779	0.04344	0.05687	0.04625	0.00815	-	
32	qlnPR3	0.20143	0.15468	0.03130	0.05608	0.04411	0.04028	0.04118	-
33	qlnPR4a	0.20210	0.15566	0.03266	0.05610	0.04649	0.04200	0.04297	0.00511
34	qlnPR4b	0.20175	0.15565	0.03327	0.05576	0.04615	0.04166	0.04262	0.00409
35	qlnRJ1	0.19860	0.15111	0.04430	0.06133	0.01672	0.04004	0.03911	0.03967

36	qlnRJ2	0.19725	0.15014	0.04304	0.06158	0.01639	0.03929	0.03800	0.03929
37	qlnRJ3	0.19859	0.15106	0.04426	0.06163	0.01672	0.04000	0.03909	0.03963
38	qlnSP16	0.19876	0.15351	0.04608	0.06581	0.01093	0.04415	0.04337	0.04411
39	qlnRJ4	0.19283	0.15123	0.03995	0.05816	0.02838	0.04345	0.04018	0.04044
40	qlnRJ5	0.19859	0.15106	0.04426	0.06163	0.01672	0.04000	0.03909	0.03963
41	qlnRJ6	0.19842	0.15112	0.04429	0.06133	0.01673	0.04038	0.03947	0.03933
42	qlnRJ7	0.19754	0.15112	0.03979	0.06299	0.03041	0.04616	0.04339	0.04343
43	qlnRS1a	0.20172	0.15516	0.04318	0.06093	0.03516	0.04477	0.04371	0.03999
44	qlnRS1b	0.20136	0.15466	0.04252	0.05991	0.03550	0.04374	0.04265	0.03896
45	qlnSP1	0.19749	0.15760	0.04201	0.05675	0.04617	0.03892	0.03731	0.03993
46	qlnSP2	0.19680	0.15774	0.04208	0.05607	0.04479	0.03926	0.03871	0.03856
47	qlnSP3	0.19141	0.15781	0.04495	0.04957	0.03653	0.03489	0.03205	0.03526
48	qlnSP4a	0.19344	0.15485	0.03526	0.05299	0.04411	0.03857	0.03695	0.03035
49	qlnSP4b	0.19379	0.15536	0.03465	0.05333	0.04377	0.03822	0.03659	0.03001
50	qlnSP5	0.19824	0.15106	0.03982	0.06196	0.02965	0.04579	0.04482	0.04304
51	qlnSP6	0.19618	0.15166	0.04060	0.06239	0.03144	0.04779	0.04495	0.04299
52	qlnSP7a	0.19860	0.15800	0.04261	0.06230	0.04572	0.04547	0.04481	0.04408
53	qlnSP7b	0.19968	0.15759	0.04128	0.06061	0.04644	0.04548	0.04484	0.04341
54	qlnSP8a	0.19647	0.15765	0.04278	0.05572	0.04581	0.03926	0.03871	0.03822
55	qlnSP8b	0.19647	0.15103	0.03982	0.06163	0.03073	0.04479	0.04373	0.04309
56	qlnSP9	0.19714	0.15665	0.04134	0.05743	0.04582	0.03926	0.03800	0.04027
57	qlnSP10	0.19851	0.16003	0.04333	0.06169	0.04546	0.04450	0.04414	0.04310
58	qlnSP11	0.19714	0.15206	0.04308	0.06240	0.03244	0.04451	0.04347	0.04175
59	qlnSP12	0.20079	0.15249	0.04535	0.06612	0.01263	0.04653	0.04583	0.04410

60	qlnSP13	0.19631	0.15781	0.04072	0.05513	0.04523	0.03864	0.03806	0.03897
61	qlnSP14	0.19871	0.15202	0.04547	0.06678	0.01161	0.04616	0.04444	0.04444
62	qlnSP15	0.19810	0.15551	0.04233	0.05883	0.04783	0.04191	0.03996	0.04192
63	qlnVZ1	0.18473	0.15430	0.07717	0.07679	0.07846	0.07431	0.07313	0.07552

		33	34	35	36	37	38	39	40
33	qlnPR4a	-							
34	qlnPR4b	0.00102	-						
35	qlnRJ1	0.04205	0.04171	-					
36	qlnRJ2	0.04168	0.04134	0.00444	-				
37	qlnRJ3	0.04202	0.04168	0.00068	0.00512	-			
38	qlnSP16	0.04649	0.04615	0.01434	0.01468	0.01432	-		
39	qlnRJ4	0.04272	0.04234	0.02464	0.02461	0.02464	0.02646	-	
40	qlnRJ5	0.04202	0.04168	0.00068	0.00512	0.00000	0.01432	0.02464	-
41	qlnRJ6	0.04173	0.04138	0.00034	0.00478	0.00034	0.01501	0.02427	0.00034
42	qlnRJ7	0.04584	0.04550	0.02596	0.02627	0.02594	0.02904	0.00000	0.02594
43	qlnRS1a	0.04443	0.04409	0.03310	0.03274	0.03306	0.03549	0.03253	0.03306
44	qlnRS1b	0.04340	0.04306	0.03276	0.03240	0.03272	0.03583	0.03329	0.03272
45	qlnSP1	0.04130	0.04096	0.03933	0.03961	0.03997	0.04479	0.03904	0.03997
46	qlnSP2	0.04062	0.04028	0.03864	0.03893	0.03860	0.04411	0.03791	0.03860
47	qlnSP3	0.03726	0.03674	0.03552	0.03695	0.03551	0.03833	0.03416	0.03551
48	qlnSP4a	0.03239	0.03273	0.03898	0.03861	0.03894	0.04136	0.03832	0.03894
49	qlnSP4b	0.03205	0.03239	0.03864	0.03827	0.03860	0.04102	0.03795	0.03860

50	qlnSP5	0.04473	0.04439	0.02592	0.02559	0.02591	0.02866	0.00187	0.02591
51	qlnSP6	0.04525	0.04488	0.02845	0.02843	0.02844	0.03068	0.00187	0.02844
52	qlnSP7a	0.04610	0.04577	0.04161	0.04234	0.04163	0.04675	0.04312	0.04163
53	qlnSP7b	0.04544	0.04510	0.04163	0.04235	0.04164	0.04677	0.04127	0.04164
54	qlnSP8a	0.04028	0.03993	0.03830	0.03927	0.03826	0.04582	0.03979	0.03826
55	qlnSP8b	0.04515	0.04481	0.02699	0.02662	0.02696	0.02972	0.00074	0.02696
56	qlnSP9	0.04164	0.04130	0.04036	0.03995	0.04031	0.04513	0.03902	0.04031
57	qlnSP10	0.04513	0.04479	0.04066	0.04135	0.04064	0.04577	0.04204	0.04064
58	qlnSP11	0.04413	0.04379	0.02733	0.02700	0.02733	0.02940	0.00450	0.02733
59	qlnSP12	0.04649	0.04615	0.01707	0.01672	0.01705	0.00477	0.02720	0.01705
60	qlnSP13	0.04104	0.04070	0.04011	0.04003	0.04004	0.04385	0.03761	0.04004
61	qlnSP14	0.04683	0.04648	0.01571	0.01570	0.01603	0.00341	0.02573	0.01603
62	qlnSP15	0.04399	0.04365	0.04231	0.04293	0.04228	0.04748	0.04146	0.04228
63	qlnVZ1	0.07814	0.07751	0.07719	0.07590	0.07713	0.07770	0.07333	0.07713

		41	42	43	44	45	46	47	48
41	qlnRJ6	-							
42	qlnRJ7	0.02562	-						
43	qlnRS1a	0.03276	0.03551	-					
44	qlnRS1b	0.03242	0.03585	0.00239	-				
45	qlnSP1	0.03968	0.04511	0.03892	0.03789	-			
46	qlnSP2	0.03831	0.04306	0.03687	0.03652	0.00579	-		
47	qlnSP3	0.03504	0.03413	0.03002	0.02953	0.00532	0.00546	-	

48 qlnSP4a	0.03934	0.04206	0.03519	0.03485	0.03479	0.03275	0.03366	-
49 qlnSP4b	0.03900	0.04172	0.03485	0.03450	0.03445	0.03241	0.03321	0.00034
50 qlnSP5	0.02561	0.00410	0.03616	0.03651	0.04440	0.04234	0.03412	0.04131
51 qlnSP6	0.02809	0.00259	0.03628	0.03703	0.04450	0.04337	0.03515	0.04310
52 qlnSP7a	0.04129	0.04340	0.03925	0.03891	0.04167	0.04064	0.03199	0.04235
53 qlnSP7b	0.04130	0.04240	0.03858	0.03824	0.04236	0.04133	0.03193	0.04167
54 qlnSP8a	0.03797	0.04477	0.03721	0.03618	0.00647	0.00477	0.00638	0.03309
55 qlnSP8b	0.02665	0.00579	0.03651	0.03685	0.04066	0.03861	0.03415	0.04000
56 qlnSP9	0.04002	0.04477	0.03858	0.03755	0.00307	0.00477	0.00290	0.03445
57 qlnSP10	0.04031	0.04242	0.03894	0.03860	0.04069	0.03966	0.03296	0.04137
58 qlnSP11	0.02770	0.00615	0.03590	0.03624	0.04344	0.04207	0.03756	0.03968
59 qlnSP12	0.01706	0.02971	0.03548	0.03582	0.04581	0.04444	0.03633	0.04306
60 qlnSP13	0.04010	0.04278	0.03729	0.03626	0.00478	0.00307	0.00388	0.03178
61 qlnSP14	0.01603	0.02935	0.03580	0.03614	0.04476	0.04476	0.03683	0.04339
62 qlnSP15	0.04196	0.04606	0.04123	0.04020	0.00755	0.00685	0.00720	0.03608
63 qlnVZ1	0.07717	0.07317	0.07070	0.07139	0.07528	0.07342	0.07809	0.07106

	49	50	51	52	53	54	55	56
49 qlnSP4b	-							
50 qlnSP5	0.04097	-						
51 qlnSP6	0.04273	0.00482	-					
52 qlnSP7a	0.04201	0.04396	0.04489	-				
53 qlnSP7b	0.04133	0.04329	0.04307	0.00375	-			

54 qlnSP8a	0.03275	0.04405	0.04522	0.04166	0.04235	-		
55 qlnSP8b	0.03965	0.00477	0.00591	0.04440	0.04409	0.04032	-	
56 qlnSP9	0.03411	0.04405	0.04446	0.04132	0.04201	0.00613	0.04032	-
57 qlnSP10	0.04103	0.04301	0.04382	0.00341	0.00511	0.04068	0.04410	0.04034
58 qlnSP11	0.03934	0.00614	0.00633	0.04374	0.04275	0.04378	0.00682	0.04378
59 qlnSP12	0.04272	0.02933	0.03140	0.04675	0.04677	0.04615	0.03073	0.04546
60 qlnSP13	0.03143	0.04208	0.04272	0.04174	0.04243	0.00444	0.03834	0.00444
61 qlnSP14	0.04305	0.02899	0.02995	0.04676	0.04678	0.04647	0.03037	0.04442
62 qlnSP15	0.03574	0.04607	0.04656	0.04263	0.04402	0.00685	0.04162	0.00720
63 qlnVZ1	0.07045	0.07322	0.07399	0.07092	0.06958	0.07666	0.07321	0.07461

	57	58	59	60	61	62	63
--	----	----	----	----	----	----	----

57 qlnSP10	-						
58 qlnSP11	0.04279	-					
59 qlnSP12	0.04577	0.03111	-				
60 qlnSP13	0.04076	0.04111	0.04486	-			
61 qlnSP14	0.04578	0.03108	0.00307	0.04518	-		
62 qlnSP15	0.04199	0.04547	0.04780	0.00653	0.04643	-	
63 qlnVZ1	0.07103	0.07645	0.07699	0.07399	0.07711	0.07389	-