



Ministério da Educação
Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



ANÁLISE POPULACIONAL DE *Cichlasoma paranaense* (OSTEICHTHYES,
PERCIFORMES, CICHLIDAE) DA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, MINAS
GERIAS, COM BASE EM MARCADORES CITOGENÉTICOS E DNA
MITOCONDRIAL

Carine de Mendonça Francisco

Uberlândia - MG

2016



Ministério da Educação
Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



ANÁLISE POPULACIONAL DE *Cichlasoma paranaense* (OSTEICHTHYES,
PERCIFORMES, CICHLIDAE) DA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, MINAS
GERIAS, COM BASE EM MARCADORES CITOGENÉTICOS E DNA
MITOCONDRIAL

Aluna: Carine de Mendonça Francisco

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Morelli

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rute Magalhães Brito

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Uberlândia com parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Genética).

Uberlândia – MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F819a
2016 Francisco, Carine de Mendonça, 1991
Análise populacional de *Cichlasoma paranaense* (Osteichthyes, Perciformes, Cichlidae) da região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, com base em marcadores citogenéticos e DNA mitocondrial / Carine de Mendonça Francisco. - 2016.
56 f. : il.

Orientadora: Sandra Morelli.
Coorientadora: Rute Magalhães Brito.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Marcadores moleculares - Teses. 3. Peixes - Citogenética - Teses. 4. DNA mitocondrial - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Brito, Rute Magalhães. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



Ministério da Educação
Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



ANÁLISE POPULACIONAL DE *Cichlasoma paranaense* (OSTEICHTHYES,
PERCIFORMES, CICHLIDAE) DA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, MINAS
GERIAS, COM BASE EM MARCADORES CITOGENÉTICOS E DNA
MITOCONDRIAL

Aluna: Carine de Mendonça Francisco

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dr.^a Sandra Morelli

Examinadores: Prof.^a Dr.^a Eliana Feldberg (INPA)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Suplentes: Prof.^a Dr.^a Luana Pereira dos Santos (UNITRI)

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Bonetti (UFU)

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

Dr.^a Sandra Morelli

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Moisés e Sandra e minha irmã Camila.

E ao meu noivo Wesley pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me dar forças.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, o Instituto de Genética e Bioquímica, aos órgãos de fomento, a Capes pelo apoio financeiro e concessão da bolsa por todo este tempo e ao projeto APQ-01708-13 – FAPEMIG.

Agradeço a minha orientadora Sandra Morelli, por mais uma oportunidade vencida. E a minha co-orientadora Rute, por todas contribuições e ensino.

A minha querida companheira Luana, por me auxiliar com suas considerações e sugestões na elaboração do meu trabalho, e pela amizade em todo esse tempo.

Aos meus amigos de laboratório, que fizeram de um ambiente de trabalho muito mais agradável. E aos técnicos, Tamiris pela amizade e José Clidenor pelo auxílio nas coletas.

Agradeço aos professores que aceitaram prontamente o convite para participar da banca.

Agradeço aos meus pais, pilares da minha vida, meus heróis. E a minha irmã Camila, pela amizade e companheirismo. Agradeço a compreensão dos meus momentos ausentes em que deixei de ficar com vocês para dedicação dos meus estudos.

Agradeço ao meu noivo Wesley, meu companheiro de todas as horas, agradeço pelo apoio, carinho, paciência, compreensão e incentivo, e por compartilhar mais um momento ao meu lado.

Aos meus amigos e familiares que me proporcionaram bons momentos, em especial a minha amiga-irmã Ana Paula e todos os outros que me proporcionaram sempre companhias agradáveis, com os quais podem contar com o meu profundo agradecimento.

Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1	Localização dos principais reservatórios para a geração de energia hidrelétrica no Brasil	6
Figura 2	Distribuição mundial da família Cichlidae	12

CAPÍTULO II

Figura 1	Mapa do Triângulo Mineiro indicando os locais de coleta dos espécimes estudados, e as Usinas Hidrelétricas	22
Figura 2	Cariótipo convencional de <i>C. paranaense</i> destacando, os pares submetidos a técnica de impregnação com nitrato de prata	25
Figura 3	Metáfases submetidas à coloração com fluorocromos base-específico	26
Figura 4	Metáfases de <i>C. paranaense</i> submetidas a técnica de bandeamento	26
Figura 5	Rede de inter-relação haplotípica das populações	28
Figura 6	Fenograma de <i>Neighbor – Joining</i> relacionando pares de populações de <i>Cichlasoma paranaense</i>	29

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Distribuição dos haplótipos exclusivos e compartilhados entre as áreas analisadas	27
Tabela 2	Distâncias genéticas entre pares de populações	27
Tabela 3	Dados citogenéticos para a espécie de <i>C. paranaense</i>	31

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Cromossomo acrocêntrico
A	Adenina
Ag	Nitrato de Prata
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
ARA	População do Rio Araguari
C	Citosina
Centrom	Regiões Cetroméricas
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
COI	Citocromo Oxidase Subunidade I
DAPI	4',6' – Diamidino – 2 – phenylidole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
FC	Fórmula cariotípica
G	Guanina
GRD	População do Rio Grande
HCl	Ácido Clorídrico
m	Cromossomo metacêntrico
NF	Número Fundamental
PAR	População do Rio Paranaíba
pb	Pares de base
PCH	Pequena Central Hidrelétrica
PCR	Polymerase Chain Reaction
PeriC	Regiões Pericentroméricas
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolo
sm	Cromossomo submetacêntrico
st	Cromossomo subtelocêntrico
T	Timina
TIJ	População do Rio Tijucu
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UHE	Usina Hidrelétrica
UV	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	1
	CAPÍTULO I	
1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1.1	A ICTIOFAUNA E A REGIÃO NEOTROPICAL	4
1.2	AS HIDRELÉTRICAS E OS IMPACTOS NAS POPULAÇÕES DE PEIXES	6
1.3	AS BACIAS HIDROGRÁFICAS	9
1.4	CITOGENÉTICA DE PEIXES E OS MARCADORES MOLECULARES	9
1.5	FAMÍLIA CICHLIDAE	14
	REFERÊNCIAS	16
	CAPÍTULO II	
1	INTRODUÇÃO	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1	<i>Área de Estudo</i>	23
2.2	<i>Caracterização Cariotípica</i>	24
2.3	<i>Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento do Gene COI</i>	25
3	RESULTADOS	26
3.1	<i>Dados Citogenéticos</i>	26
3.2	<i>DNA mitocondrial</i>	29
4	DISCUSSÃO	31
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

APRESENTAÇÃO

A região sudeste do Brasil apresentou uma crescente demanda de energia elétrica nas últimas décadas devido ao aumento da população e devido ao desenvolvimento industrial. Com isso, muitos rios brasileiros se transformaram em uma sucessão de barragens para a construção de usinas hidrelétricas, utilizadas como fontes de energia. As barragens criadas e as construções de reservatórios geram diversos impactos sobre a fauna e a flora, dentre eles podem ocorrer, mudanças na fauna de peixes, impedindo o fluxo natural das águas dos rios, fragmentação de habitats, inundações de grandes áreas, alterações no regime hídrico natural, na qualidade da água e na reprodução da ictiofauna local. Como resultados dessas construções, impactos negativos são gerados sobre as populações de peixes locais, bloqueando as rotas migratórias e provocando o isolamento de populações nativas. Consequências disso podem levar a uma perda da variabilidade genética, redução do valor adaptativo médio populacional e risco de extinção local de espécies. Diante destes fatos, este trabalho teve como objetivo analisar 4 populações de peixes, pertencente à região hidrográfica do Alto Paraná que sofreram alterações devido à construção de usinas hidrelétricas. A análise cromossômica apresentada fornece dados suplementares sobre a ictiofauna da região, considerado um importante aspecto para estudos evolutivos. Na tentativa de esclarecer premissas de que indivíduos expostos a variações ambientais estão sujeitos a alterações no ciclo celular, foi feito um estudo populacional, utilizando DNA *barcoding*, permitindo assim obter uma correlação entre a distância geográfica e genética das diferentes populações analisadas, verificando se há um isolamento gênico ou não entre as populações pertencentes aos diferentes rios.

RESUMO

No Brasil, foram construídas diversas usinas hidrelétricas ao longo dos anos e na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, isolando partes dos rios. Os peixes têm sofrido grandes impactos, com a construção de reservatórios, alterando o ciclo biológico dessas espécies que estão relacionados aos ciclos hidrológicos, alterando a conectividade entre o rio e áreas de reprodução. A espécie *Cichlasoma paranaense* (família Cichlidae), foi escolhida pois ocorre em diferentes regiões do Triângulo Mineiro, e os marcadores citogenéticos utilizados foram Ag-RONs, DAPI, Cromomicina e bandeamento C e um molecular foi o sequenciamento parcial da COI mitocondrial. Assim, o objetivo foi avaliar se o tempo de implementação das barragens nos Rios Araguari, Tijuco, Paranaíba e Grande foi suficiente para afetar a variabilidade genética das populações desta espécie. A bacia do Rio Paranaíba apresenta um total de dezesseis usinas hidrelétricas instaladas ao longo dos seus principais cursos d'água. Os dados citogenéticos referentes ao número e morfologia cromossômica ($2n$) das populações corroboram o conservadorismo cariotípico dos ciclídeos neotropicais, apresentando em sua maioria cromossomos com $2n=48$ subtelo-acrocêntricos com Ag-RONs simples. Variações na fórmula cariotípica (FC) e nas marcações de bandeamento C, e variações na rede de haplótipos foram observadas e podem ser consequência do isolamento populacional imposto pela construção de barragens ao longo dos anos nestes rios. A proximidade genética entre as populações do Rio Grande e Paranaíba, geograficamente distantes, nos levam a sugerir que outras regiões do DNAm e do DNA nuclear devem ser sequenciadas e novos marcadores devem ser empregados, como os microssatélites. Que irá possibilitar identificar mais precisamente as relações genéticas entre as populações aqui estudadas, e possivelmente com populações de rios onde não há barragens, podendo auxiliar futuras ações de conservação nos rios do Triângulo Mineiro.

Palavras chave: 1. Cromossomos 2. Marcadores moleculares 3. Peixes 4. Usinas Hidrelétricas.

ABSTRACT

In Brazil, several hydropower plants were built over time in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba mesoregion, isolating parts of the rivers. With the construction of reservoirs fish have suffered major impacts, changing the life cycle of those species that are related to hydrological cycles, changing the connectivity between the river and breeding areas. The species *Cichlasoma paranaense* (family Cichlidae), was chosen because it occurs in different regions of Triângulo Mineiro, and cytogenetic markers used were Ag-NORs, DAPI, Chromomycin and C banding and a molecular was the partial sequencing of the mitochondrial COI. Therefore, the objective was to assess whether the implementation time of the dams on the Rivers Araguari, Tijuco, Paranaíba and Grande was enough to affect the genetic variability of the populations of this species. The basin of the Paranaíba River has a total of sixteen hydroelectric plants installed along its main watercourses. Cytogenetic data on the number and chromosome morphology (2n) of the population confirm the karyotype conservatism of Neotropical cichlids, featuring mostly chromosomes with 2n = 48 subtelomeric simple Ag-NORs. Variations in karyotype formula (KF) and markings C banding, and variations in the haplotype network were observed and may be a consequence of population isolation imposed by dam construction over the years in these rivers. The genetic similarity between populations of Rio Grande and Paranaíba, geographically distant, lead us to suggest that other regions of the mtDNA and nuclear DNA must be sequenced and new markers should be employed, such as microsatellites, which will enable to identify more precisely the genetic relationships among populations studied here, and possibly with populations of rivers where there are no dams, and may help future conservation actions in the rivers of Triângulo Mineiro.

Keywords: 1. Chromosomes 2. Molecular markers 3. Fish 4. Hydroelectric plants.

CAPÍTULO I

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 A ICTIOFAUNA E A REGIÃO NEOTROPICAL

Os peixes representam mais da metade de todas as espécies de vertebrados vivos no mundo, podendo ser representados por aproximadamente 8,7 milhões de espécies; estima-se que 91% das espécies aquáticas ainda não são descritas (MORA et al., 2011). Entre as 13.000 espécies de água doce estimadas para o planeta acredita-se que a região neotropical abrigue mais de 5.600 espécies, mas as estimativas apontam que esse número seja superior a 7.000 (ALEBERT; REIS, 2011).

A diversidade da ictiofauna pode estar relacionada com processos geomorfológicos, descobertas paleontológicas, distribuição dos climas entre outros, que possivelmente estão relacionados com a diversidade genética presente neste grupo, propiciando uma riqueza de espécies. Com isso, dividir o planeta em regiões zoogeográficas foi uma maneira de compreender melhor essa biodiversidade (como propôs Alfred Russel Wallace, em 1876) em regiões como: Neoártica, Neotropical, Paleoártica, Africana, Oriental e Australiana, reconhecidas até o presente momento (HELFMAN et al., 2009). A região Neotropical compreende desde o Deserto de Sonora (na fronteira do México com os Estados Unidos) até o limite sul da América do Sul (NIRCHIO; OLIVEIRA, 2006). No que se refere ao número de espécies de peixes apresenta-se como uma das mais diversificadas e complexas (REIS, KULLANDER, FERRARIS, 2003).

A biogeografia compreende o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas. Neste contexto, interpretar a distribuição geográfica em um nível intraespecífico e uma perspectiva histórica, permite inferir processos que levam à divergência entre populações (AVISE et al., 1987).

Martins e Domingues (2011) revisaram o histórico da Filogeografia, no Brasil destacando o panorama da produção científica nos diferentes níveis de grupos taxonômicos. Compreenderam que, após a publicação do conceito de filogeografia

por Avise e colaboradores (1987), inúmeros pesquisadores adotaram a disciplina como ferramenta de estudo, de modo que nos anos de 1987 a 2009 foram publicados cerca de 4.500 artigos na comunidade científica universal sobre este assunto. Este recente progresso no estudo da filogeografia demonstra um interesse da comunidade científica em compreender os processos e os padrões da distribuição dos organismos.

Os vertebrados aquáticos representam apenas 14% da produção científica filogeográfica no Brasil (MARTINS; DOMINGUES, 2011) e os peixes que estão inseridos neste meio compõem um importante modelo para compreender os fatores históricos, envolvidos nos processos de especiação, pois estão restritos a um ambiente aquático e permitem correlacionar eventos paleohidrológicos das bacias hidrográficas com estruturas genéticas de populações atuais (SANTOS et al., 2009).

O desenvolvimento da filogeografia no decorrer da década de 70 está relacionado com o avanço de tecnologias e marcadores moleculares (como exemplo, DNA mitocondrial). Foi nesta década que os primeiros trabalhos de citogenética de peixes foram publicados em duas espécies de *Astyanax* (JIM; TOLEDO, 1975), espécies das famílias Pimelodidae (TOLEDO; FERRARI, 1976), Cichlidae e Loricariidae (MICHELE; TAKAHASHI; FERRARI, 1997). Atualmente, mais de 920 espécies de peixes neotropicais já foram cariotipadas, as quais estão distribuídas em aproximadamente 250 gêneros e 45 famílias (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF; 2009).

Estudos realizados em pequenos cursos de água têm demonstrado que as comunidades destes ecossistemas aquáticos são submetidas constantemente a mudanças nas condições hidrodinâmicas (MATTHEWS, 1998), principalmente em função da pluviosidade e de fatores abióticos associados (PERES NETO; BIZERRIL; IGLESIAS, 1995; BIZERRIL 1997). Para os peixes, estas mudanças estacionais decorrentes da expansão e contração do ambiente aquático durante as variações climáticas podem influenciar a alimentação, reprodução e tamanho das populações (WELCOMME, 1969, MATTHEWS, 1982, MEFFE; SHELDON, 1988, ANGERMEIER; SCHLOSSER, 1989, CASATTI, 2005), fato que lhes confere complexidade no estudo e consequente conservação.

1.2 AS HIDRELÉTRICAS E OS IMPACTOS NAS POPULAÇÕES DE PEIXES

No Brasil, água e energia têm uma forte e histórica interdependência, de forma que a contribuição da energia hidráulica ao desenvolvimento econômico do país tem sido expressiva. Seja no atendimento das diversas demandas da economia, atividades industriais, agrícolas, comerciais e de serviços, ou da própria sociedade, melhorando o conforto das habitações e a qualidade de vida das pessoas. Em maio de 2016, havia registro de 206 Usinas Hidrelétricas e 558 centrais hidrelétricas em operação no Brasil, e a sua maioria localizada na Bacia do Paraná (ANEEL, 2016).

A energia hidráulica no Brasil gera cerca de 90% de toda a eletricidade produzida no país. Apesar da tendência de aumento de outras fontes, devido a restrições socioeconômicas e ambientais de projetos hidrelétricos e os avanços tecnológicos no aproveitamento de fontes não-convencionais, tudo indica que a energia hidráulica continuará sendo, por muitos anos, a principal fonte geradora de energia elétrica do Brasil. Embora os maiores potenciais remanescentes estejam localizados em regiões com fortes restrições ambientais e distantes dos principais centros consumidores, em 2004, a ANEEL estimou que pelo menos 50% da necessidade de expansão da capacidade de geração seria de origem hídrica (ANEEL, 2004).

A região sudeste do Brasil apresentou um forte crescimento industrial nas últimas décadas. Para suprir a demanda energética decorrente desse crescimento, foram construídas diversas usinas hidrelétricas (Figura 1), cujas barragens impedem o fluxo natural das águas dos rios. A construção de reservatórios gera diversos impactos sobre a fauna e a flora, dentre eles, podem ocorrer mudanças na fauna dos peixes (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

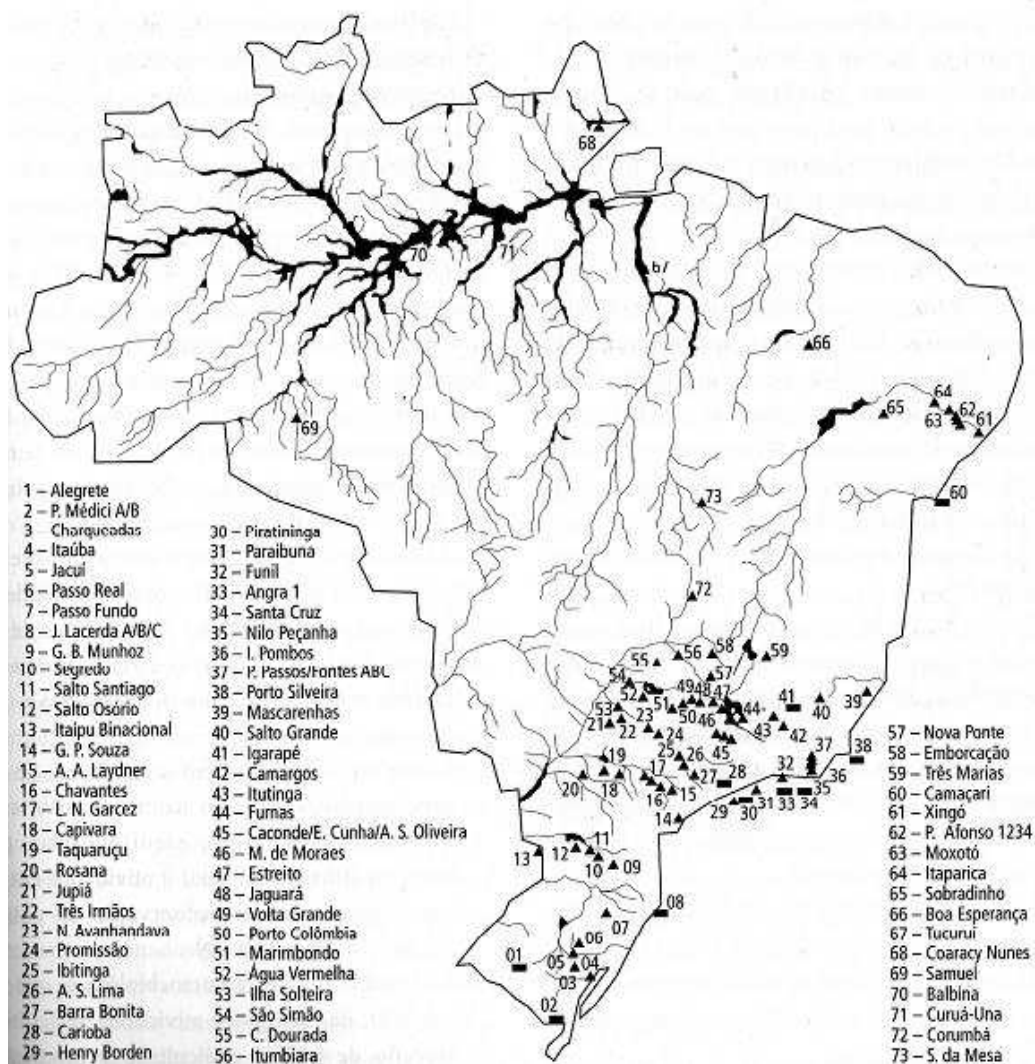
A diminuição da abundância de certas espécies de peixes ou mesmo a extinção de algumas delas têm ressaltado a importância e a necessidade de programas de conservação ambiental, principalmente, diante de impactos diretamente promovidos pelas atividades antrópicas. Mas, sobretudo, tais programas de conservação devem garantir que as medidas adotadas sejam realmente efetivas verificando, para isso, a manutenção da biodiversidade local (BARROCA, 2012).

O Brasil contém cerca de 20% de toda a água doce do planeta, sendo dotado de uma vasta e densa rede hidrográfica. Seus rios possuem um alto potencial para a geração de energia elétrica, já que são, em sua maioria, rios de planalto com grandes extensões, largas e profundidades, além de possuírem em seu leito rupturas de declive e vales encaixados (Ministério do Meio Ambiente, 1998). O volume de geração de energia das Usinas Hidrelétricas excede as demais energias renováveis, como por exemplo, a eólica, geotérmica ou a fotovoltaica (LOPES; PRADO; FONSECA, 2009).

As Usinas Hidrelétricas são menos poluentes do que as Usinas Térmicas ou Nucleares, apesar de poderem gerar gases pela decomposição de matéria orgânica, contribuindo com o efeito estufa (BEDORE; LOPES, 2008). Cerca de 90% da energia consumida no país provém de Usinas Hidrelétricas e por esse motivo, muitos rios brasileiros têm sido transformados numa sucessão de barragens, provocando uma fragmentação de habitats, inundações de grandes áreas, alterações no regime hidrológico natural, na qualidade da água e na reprodução da ictiofauna local (MARTINS; TAMADA, 2000).

Apesar de não serem grandes poluentes, os grandes reservatórios são uma das principais fontes de impacto sobre os recursos pesqueiros, podendo ser considerados como a principal ameaça à conservação de peixes migradores de água doce. O barramento causa modificações no regime hidrológico, bloqueio de rotas migratórias de espécies de peixes, que necessitam de se deslocarem à montante para desova no período reprodutivo, aprisionamento de nutrientes e diminuição da fertilidade de planícies (BEDORE; LOPES, 2008).

Na região neotropical, os peixes têm sofrido imensos impactos com a construção de reservatórios, descarga de efluentes agrícolas, domésticos e industriais nos rios, e a degradação da mata ciliar. O ciclo biológico dessas espécies está relacionado aos ciclos hidrológicos dos rios, ou seja, os ciclos de cheias e secas, ocasionado pelos períodos secos e chuvosos, e que também são alterados com o represamento. Acima da barragem a área está permanentemente inundada pelo reservatório e abaixo da barragem, as cheias são reduzidas, ou ocorrem em períodos errados, alterando a conectividade entre o rio e áreas de reprodução, além de interferir no estímulo para a desova (CAROSFELD et al., 2003).



Fonte: Tundisi, Tundisi (2008).

Figura 1 Localização dos principais reservatórios para a geração de energia hidrelétrica no Brasil (reservatórios com altura da barragem maior que 15 m), podendo-se observar uma maior concentração na região sudeste.

Os efeitos das barragens em espécies de peixes vêm sendo documentados em todo o mundo (MORITA; YAMAMOTO, 2001; NERAAS; SPRUELL, 2001; HEGGENES; ROED, 2006; REID et al., 2008) e por isso estudos que visam qualificar e quantificar esses impactos são frequentemente observados. Geralmente, há um declínio da população devido à mudança de um ambiente de rio para um ambiente lacustre e também pelo isolamento dos peixes migratórios dos locais de desova e alimentação. Essa ruptura pode levar à uma extinção local

caso os habitats críticos forem perdidos ou se tornarem inacessíveis (GODINHO; GODINHO, 1994; NERAAS; SPRUELL, 2001).

1.3 AS BACIAS HIDROGRÁFICAS

A Bacia Hidrográfica do Rio Paraná, é a principal bacia do Brasil e segunda maior bacia hidrográfica do planeta. Seus principais rios são: Paraná, Paraguai e Uruguai. A bacia do Rio Paraná apresenta o maior potencial hidrelétrico instalado no país. O Rio Paraná, principal formador da bacia do Prata, é o décimo maior do mundo em descarga, e o quarto em área de drenagem, drenando todo o centro sul da América do Sul. Em território brasileiro drena uma área de 880 mil Km² aproximadamente, e os principais tributários do Rio Paraná são os Rios Grande e Paranaíba (que são os formadores), Tietê, Paranapanema e Iguaçu.

Entre os principais formadores do Rio Paraná destacam-se o Rio Grande, que nasce na Serra da Mantiqueira e corre ao longo de 1.300km no sentido leste - oeste, e o Rio Paranaíba, que é formado por muitos afluentes. Afluentes como o Rio Araguari e Tijuco. O Rio Araguari nasce no Parque Nacional da Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas e percorre cerca de 470 Km até a sua foz no Rio Paranaíba. E o Rio Tijuco situa-se na mesoregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, abrangendo um total de aproximadamente 250 km e 11 municípios, que corresponde cerca de 27% do estado de Minas Gerais.

1.4 CITOGENÉTICA DE PEIXES E OS MARCADORES MOLECULARES

Os peixes representam mais da metade de todas as espécies de vertebrados vivos no mundo, podendo ser representados por aproximadamente 28.000 espécies válidas (NELSON, 2006). A citogenética compreende o estudo dos cromossomos e permite um melhor conhecimento da estrutura, organização e comportamento dos mesmos (NIRCHO; OLIVEIRA, 2006).

Analisar cariótipos de localidades diferentes, utilizando diversas técnicas de marcações cromossômicas, caracteriza espécies de modo mais completo, possibilitando encontrar e entender casos de polimorfismo cromossômico, restritos a determinadas localidades (KASAHARA, 2009). Os marcadores citogenéticos

fornece resultados na comparação de espécies intimamente relacionadas. Alguns caracteres citogenéticos, como o número e a distribuição de regiões organizadoras de nucléolos (RONS), podem ajudar a entender a evolução cariotípica dos peixes.

Na família Cichlidae, algumas espécies apresentaram marcação de Ag-RONS no primeiro par do complemento, enquanto em outras espécies a Ag-RON foi observada em outro par cromossômico do complemento, caracterizando a ocorrência de rearranjos envolvendo essa região (FELDBERG et al., 2003). Os peixes neotropicais podem apresentar dois padrões de distribuição de Ag-RONS: em alguns grupos esses sítios estão localizados em um único par de cromossomos (Ag-RONS simples), enquanto outros grupos os apresentam em vários cromossomos do cariótipo (Ag-RONS múltiplas) (MOREIRA-FILHO, 1983).

A técnica de detecção de heterocromatina (Banda C) é de suma importância para o estudo cariotípico nos peixes Neotropicais, constituindo juntamente com as Ag-RON metodologias fundamentais para caracterização citogenética básica de quaisquer organismos, pois permitem a identificação de cromossomos particulares, revelando informações úteis para estudos taxonômicos e evolutivos (AMORES et al., 1993). A ausência da atividade gênica, chamada replicação tardia do DNA, é a principal característica da heterocromatina, isto é, a heterocromatina inicia sua replicação depois da eucromatina no final da fase S do ciclo celular. Durante todo o ciclo celular, a heterocromatina se encontra condensada em todas as células do indivíduo, e possui geralmente sequências de DNA altamente repetitivas (GUERRA, 1988).

A quantidade de heterocromatina constitutiva varia entre as espécies, porém se localiza preferencialmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas, podendo também estar presente nas regiões intersticiais e nos cromossomos sexuais (SUMNER, 1990). Há dois tipos distintos de heterocromatina: constitutiva e facultativa. A constitutiva se caracteriza por permanecer condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo; aparece em ambos os homólogos, na mesma posição e com o mesmo tamanho; não contém genes estruturais (BROWN, 1966).

Além das técnicas citogenéticas, novas técnicas estão sendo usadas para estudo dos peixes Neotropicais. As análises de DNAs satélites, por exemplo, fornecem dados importantes no que diz respeito à composição da heterocromatina

e à origem dos cromossomos supranumerários e sexuais (MESTRINER et al., 2000; JESUS et al., 2003; VICENTE et al., 2003; PAZZA, 2005).

Sequências satélites são altamente repetidas, variando de 100 a 300 pb (pares de bases) de comprimento e de 1.000 a mais de 100.000 cópias no genoma. Em geral, localizam-se nas regiões terminais e centroméricas de um ou mais loci cromossômicos (MARTINS, 2006). Por possuírem densidade própria podem ser purificadas por centrifugação em gradiente de densidade de cloreto de Césio, constituindo frações “satélites” em relação ao restante do DNA genômico (FARAH, 2007). Adicionalmente, vários trabalhos mostram que a distribuição dos DNAs satélites coincide com o padrão de bandamento C dos cromossomos (heterocromatina constitutiva), sugerindo que sejam um importante componente desta (MIKLOS, 1985).

Em peixes, as análises citogenéticas podem indicar diferenças nos cariótipos, distinguir populações naturais e criar oportunidades de estabelecer padrões na evolução cromossômica (BERTOLLO et al., 2000, JACOBINA et al., 2009). Com estes marcadores é possível verificar quais rearranjos cromossômicos estão sendo mais comuns e criar possíveis hipóteses para o entendimento do processo evolutivo da família. A associação da citogenética clássica com a molecular possibilitou um grande desenvolvimento da citogenética de peixes, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura e evolução do cariótipo, cromossomos sexuais, cromossomos B, polimorfismos cromossômicos, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004).

O uso de ferramentas da biologia molecular permite um melhor acesso às relações filogenéticas e filogeográficas em peixes (HUBERT et al., 2007, WILLIS et al., 2010). Ferramentas moleculares são modernos e efetivos recursos que possibilita análises genéticas em larga escala, tornando-se de uso rotineiro em muitos laboratórios do mundo (POKE et al., 2005). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares genéticos estão sendo amplamente utilizados e suas funções dependem da natureza da informação (dominância, co-dominância,

poliploidia), dos equipamentos disponíveis em laboratórios e do nível de variabilidade do marcador, ou seja, se ele é muito ou pouco polimórfico (ANNE, 2006). A grande vantagem do uso de marcadores nucleares que se encontram em regiões não codificantes, é seu alto grau de polimorfismo, ou seja, os loci são geralmente caracterizados por uma alta heterozigosidade (SCHLOTTERER, 2000; ZANE; BARCELONI; PATARNELLO, 2002; ELLEGREN, 2004).

Os microssatélites, desde a última década tornaram-se um dos marcadores moleculares mais utilizados em análise populacional (SCHLOTTERER, 2004) e caracterizam-se por blocos repetitivos de sequências idênticas ou similares, dispostas em tandem, encontrados em todos os genomas eucariotos estudados até o momento (ZANE; BARCELONI; PATARNELLO, 2002). O potencial de se utilizar esses marcadores por meio de amplificação por PCR abriu as portas para uma ampla gama de aplicações nas Ciências Biológicas e, particularmente, na genética de populações (JARNE; LAGODA, 1996; SUNNUCKS, 2000).

Neraas e Spruell (2001) determinaram o efeito da fragmentação de habitat na estrutura genética de trutas (*Salvelinus confluentus*), causadas por usinas hidrelétricas no Rio Fork (EUA), através da análise de microssatélites. Foi constatado que os indivíduos que se aglomeravam na base de uma barragem pertenciam às populações à montante da represa. Isso indica que esses indivíduos foram impedidos pela represa de realizar a migração, constatando a necessidade de mecanismos de transposição.

Taylor, Stamford e Baxter (2003), também demonstraram através de microssatélites, que populações de outra espécie de truta (*Oncorhynchus clarki lewisi*) de diferentes locais de uma bacia no Canadá eram compostas de unidades demográficas distintas. Isso se deve ao fato de que a maioria da variação molecular foi observada entre populações e devido também à alta frequência de alelos restritos a algumas populações. Além disso, a significativa divergência entre populações acima e abaixo de barreiras é consistente com o isolamento físico e independência demográfica, o que ressalta que procedimentos de manejo devem levar em conta populações isoladas.

Nos últimos anos a técnica conhecida como DNA *Barcoding*, proposta por Hebert et al. (2003), tem se destacado como uma ferramenta para identificação molecular de espécies, visando o rápido crescimento de conhecimento referente à

biodiversidade. Tal técnica tem demonstrado ser eficiente para identificação de espécies em muitos grupos de organismos, incluindo peixes (STEINKE et al., 2009), aves (KERR et al., 2007), mamíferos (BORISENKO et al., 2007), insetos (HEBERT et al., 2004), plantas (KRESS et al., 2005) e fungos (SCHOCH et al., 2012).

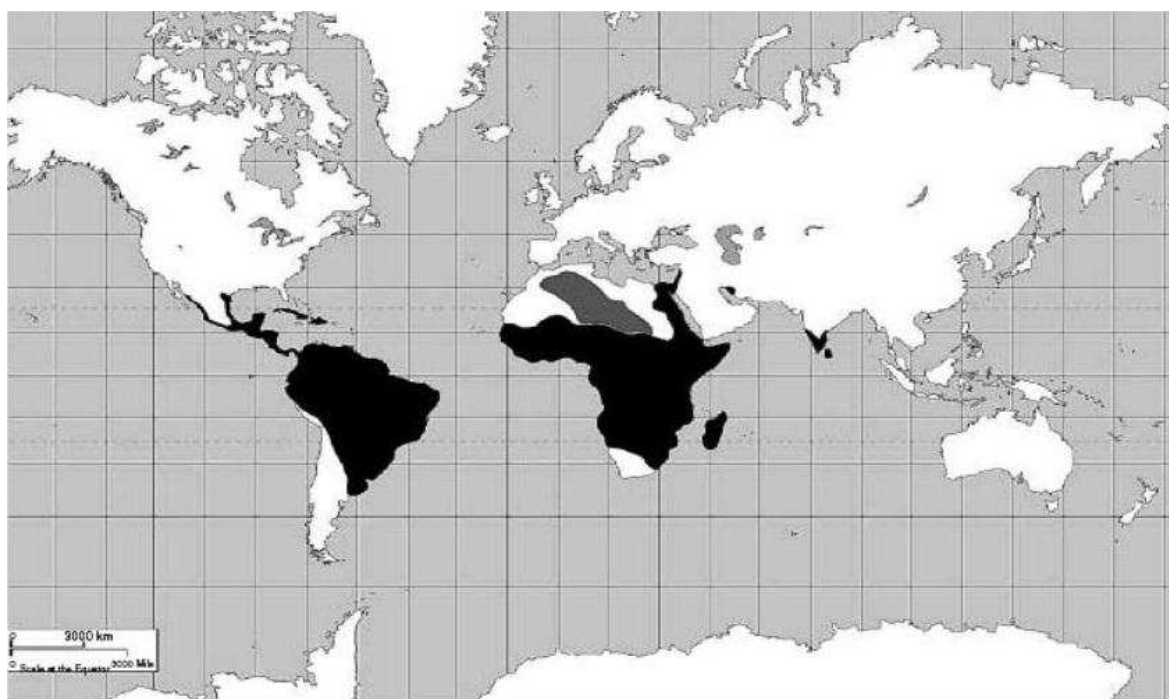
No genoma, na sequência de nucleotídeos existem regiões conservadas entre membros de um táxon, mas que podem variar entre os táxons devido pressão exercida pela seleção natural (BLAXTER, 2004). Baseados nisso, propuseram o emprego da técnica denominada DNA *Barcoding* identificando qualquer espécie animal por meio da utilização de um fragmento de 650 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI). A sequência nucleotídica escolhida é tida como um marcador universal para espécies animais, e possui vantagens como identificação de espécies crípticas e de um organismo em todos os seus ciclos de vida (ovos, larvas, indivíduos maduros) (HEBERT et al., 2003).

O gene COI, responsável por codificar parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria, apresenta baixa variação dentro de uma mesma espécie quando comparada com variações entre espécies (WARD, 2009). Embora outros segmentos gênicos tenham sido sugeridos para o mesmo fim, como os genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (VENCES et al., 2005), o gene COI continuou a ser utilizado como padrão por seu aparente melhor desempenho (HENRIQUES, 2010).

Com o propósito de compreender a dinâmica populacional, os padrões de dispersão e a colonização nas áreas de distribuição, as populações naturais são classificadas em diferentes categorias filogeográficas, com base na variação do DNAm relacionando com as distribuições geográficas dos clados (AVISE, 2000), as categorias são representadas de I a V. Categoria I: regiões geográficas separadas e haplótipos mitocondriais distintos dentro da distribuição da espécie. Categoria II: linhagens co-distribuídas em uma grande área com pronunciada descontinuidades filogenéticas entre os haplótipos. Categoria III: maioria dos haplótipos estreitamente relacionados, ainda que isolados geograficamente. Categoria IV: nenhum isolamento geográfico populacional e haplótipos estreitamente relacionados. Categoria V: linhagens largamente distribuídas com haplótipos exclusivos.

1.5 FAMÍLIA CICHLIDAE

A família Cichlidae possui mais de 3000 espécies de peixes e é considerada uma das mais ricas dentro dos vertebrados (NELSON, 2006). É considerada um grupo monofilético (STREELMAN; KARL, 1997, SPARKS; SMITH, 2004) e está distribuída principalmente na América Latina, África e Madagascar (Figura 2) (CHAKRABARTY, 2004), com poucas espécies no sul da Índia e no Oriente Médio (GENNER et al., 2007), sendo também encontrada nos grandes lagos da África Oriental (KORNFIELD; SMITH, 2000, KOCHER, 2004; GENNER et al., 2007).



Fonte: Chakrabarty, 2004.

Figura 2. Distribuição mundial da família Cichlidae.

Os estudos citogenéticos em ciclídeos foram realizados principalmente a partir de 1975, destacando os trabalhos de Oyhenart-Perera e colaboradores (1975), Michele; Takahashi (1977), Kornfield (1978), Thompson (1979), Vervoort (1980) e Feldberg; Bertollo (1985). O impulso científico na década de 70 contribuiu com o aumento na produção dos trabalhos em citogenética de peixes, dentre estes, diversos pertencentes à família Cichlidae. Porém os estudos cromossômicos na família ainda necessitam de técnicas de bandeamentos mais sofisticadas, pois a

maior parte dos rearranjos cromossômicos observados são postulados apenas com caracterização cromossômica padrão.

Thompson (1979) descreveu o cariótipo de 41 espécies de ciclídeos neotropicais e observou através das espécies analisadas que a evolução cromossômica aparenta ter sido conservativa, mantendo o número diploide ancestral de $2n=48$ cromossomos subtelo-acrocêntricos. Ainda, um segundo padrão cariotípico mais raro foi descrito, obtendo um maior número de cromossomos metacêntricos. Também foram obtidos dados para seis espécies Africanas, encontrando-se variação no número de cromossomos de $2n=40$ em *Astatotilapia burtoni* até $2n=46$ em *Melanochromis auratus* (THOMPSON, 1981). Thompson considera que para os ciclídeos neotropicais o cariótipo ancestral é representado por $2n=48$ cromossomos acrocêntricos de modo que qualquer diferença desta condição representaria um estado evolutivo derivado (THOMPSON, 1979).

REFERÊNCIAS

- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. **University of California Press**. Oakland, 2011.
- ALFRED, R. W. The geographical distribution of animals. **Macmillan**. London, 1876.
- AMORES, A.; et al. Karyotype, C-banding, and Ag-NOR analysis in *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciforms). Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. **Genome**, v. 36, n. 4, p. 672-675, 1993.
- ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, v. 127, n. 3, p. 101-120, 2006.
- ANEEL, 2004. **Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil)**. Disponível em: <[http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/04-Energia_Hidraulica\(2\).pdf](http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/04-Energia_Hidraulica(2).pdf)>. Acesso em: 12 maio 2016.
- ANEEL, 2016. **Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil)**. Disponível em: <<http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm>>. Acesso em: 12 maio 2016.
- ANGERMEIER, P. L.; SCHLOSSER, I. J. Species-Area Relation ship for Stream Fishes. **Ecology**, v. 70, n. 5, p. 1450-1462, 1989.
- AVISE, J. C.; et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. United States of American, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BARROCA, T. M. **Análise da variabilidade genética de *Prochilodus* spp. (*Prochilodontidae*) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis**. 2012. p. 150. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.
- BEDORE, A. G.; LOPES, J. M. Peixamento como medida ambiental mitigadora do impacto na ictiouna. **Revista Ação Ambiental**. Viçosa, v. 11. n. 39. p. 28-34, 2008.
- BERTOLLO, L. A. C.; et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, n. 7, p. 603-613, 2000.
- BIZERRIL, C. R. S. F. Mudanças temporais de comunidades ícticas em uma bacia hidrográfica do leste brasileiro. **Co-municações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, v. 10, p. 53-75, 1997.
- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 669-679, 2004.
- BORISENKO, A. V.; et al. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 3, p. 471-479, 2007.
- BROWN, S. W. Heterochromatin. **Science**, v. 151, p. 417-425, 1966.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory fishes of South America. **World Fisheries Trust**. Canada, 2003.

CASATTI, L. Fish assemblage structure in a first order stream, southeastern Brazil: longitudinal distribution, seasonality, and microhabitat diversity. **Biota Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 75-83, 2005.

CHAKRABARTY, P. Cichlids Biogeography: Comment and Review. **Fish and Fisheries** v. 5, n. 2, p. 97 – 119, 2004.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.

FARAH, S. B. Decifrando o genoma humano. **DNA Segredos e Mistérios**, p.155-202, 2007.

FELDBERG, E. **Estudos citogenéticos em 10 espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes)**. 1983. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1983.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia**, v. 38, n. 3-4, p. 319-324, 1985.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. **Fish adaptations**, p. 285-308, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Cenargen, 220 p., 1996.

GALETTI JÚNIOR, P. M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. **Guerra, M. FISH (Fluorescent hibidization in situ) Conceitos e aplicações**, Cap, v. 3, 2004.

GENNER, M. J.; et al. Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1269–1282, 2007.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 5, n. 1, p. 187-197, 1994.

Guerra, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988.

HEBERT, P. D. N.; et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceeds of National Academy of Science**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, out., 2004.

_____. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, jan., 2003.

HEGGENES, J.; ROED, K. H. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*) Microgeographic differentiation in a fragmented river. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 15, n. 4, p. 366-375, 2006.

HELFMAN, G. S.; et al. **The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology**. John Wiley & Sons, 2009.

HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA Barcode) dos peixes da Bacia do Rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do Estado de São Paulo**. São Paulo, 105 p., 2010.

HUBERT, C.; et al. Surface plasmon spectral characteristics of second harmonic generation in gold Nanorods. **Applied Physics Letters**, p. 90, 2007.

JACOBINA, U.; et al. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi, Erythrinidae) from

coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropicalchthyol**, v. 7, p. 617-622, 2009.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in ecology & evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

JESUS, C. M.; et al. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2003.

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

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados** São Paulo: Editora SBG, 2009.

KERR, K.C.R.; et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular ecology notes**, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2007.

KOCHER T. D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 4, p. 288-298, 2004.

KORNFIELD, I. L. Evidence for rapid speciation in cichlid fishes. **Experientia**, v.34, p. 335-336, 1978.

KORNFIELD, I.; SMITH, P. F. African cichlid fishes: model systems for evolutionary biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 163-196, 2000.

KRESS, W. J.; et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceeds of National Academy of Science**, v. 102, n. 23, p. 8369-8374, jun., 2005.

MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. **Revista da Biologia**, p. 26-30, 2011.

MARTINS, S. L.; TAMADA, K. **Sistemas para a transposição de peixes**. Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, BT/ PHD/72. São Paulo: EPUSP, 2000.

MARTINS, C. **Chromosomes and repetitive DNAs**: a contribution to the knowledge of fish genome. Fish Cytogenetics. United States of American: Science Publisher, 2006.

MATTHEWS, W. J. Small fish community structure in Ozark streams: structured assembly patterns or random abundance of species. **American Midland Naturalist**, p. 42-54, 1982.

_____. **Patterns in freshwater fish ecology**. New York: Chapman and Hall, 756 p., 1998.

MEFFE, G. K.; SHELDON, A. L. The influence of habitat structure on fish assemblage composition in southeastern black water streams. **American Midland Naturalist**, v. 120, n. 2, p. 225-240, 1988.

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

MICHELE, J. L.; TAKAHASHI, C. S. Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). **Cytologia** v. 42, n. 3-4, p. 535-537, 1977.

MICHELE, J. L.; TAKAHASHI, C. S.; FERRARI, I. Karyotypic Study of Some Species of the Family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v. 42, n. 3-4, p. 539-546, 1997.

MIKLOS, G. L. G. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. **Molecular evolutionary genetics**, p. 241-321, 1985.

MORA, C.; et al. How many species are there on Earth and in the ocean?. **Plos Biology**, v. 9, n. 8, p. 100-127, 2011.

MOREIRA FILHO, O. **Estudos na família Paradontidae (Pisces, Cypriniformes) da bacia do rio Passa-Cinco, SP: Aspectos citogenéticos e considerações correlatadas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 1983.

MORITA, K., YAMAMOTO, S. Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. **Conservation Biology**, v. 5, n. 16, p. 1318-1326, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. New York: John Wiley & Sons, 2006.

NERAAS, L. P.; SPRUELL, P. Fragmentation of Riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1153-1164, 2001.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. Porlamar: Gráficas Internacional, 2006.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

OYHERNART PERERA, M. F.; LUENGO, J. A.; BRUM ZORRILA, N. Estúdio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jennyns) y *Crenicichla sexatilis* (LINN) (Teleostei, Cichlidae). **Revista Biol. Uruguai**, v. 3, n. 1, p. 29-36, 1975.

PAZZA, R. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 124 p., 2005.

PERES NETO, P. R.; BIZERRIL, P. R.; IGLESIAS, R. An overview of some aspects of river ecology: a case study on fish assemblages distribution in an eastern Brazilian coastal river. **Oecologia Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 317-334, 1995.

POKE, F.; et al. Genomic research in eucalyptus. **Genetica**, v. 125, n. 1, p. 79-101, 2005.

REID, S. M.; et al. Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 531-546, 2008.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2003.

SANTOS, U.; et al. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 9, p. 2326-2343, 2009.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCHOCH, C. L.; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceeds of National Academy of Science**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, fev., 2012.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

SPARKS, J. S.; SMITH, W. L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes

(Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**, v. 20, n. 6, p. 501-517, 2004.

STEINKE, D.; et al. DNA *barcoding* of Pacific Canada's fishes. **Marine Biology**, v. 156, n. 12, p. 2641-2647, 2009.

STREELMAN, J. T.; KARL, A. Reconstructing labroid evolution with single-copy nuclear DNA. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1384, p. 1011-1020, 1997.

SUMNER, A. T. **Chromosome Banding**. Unwin Hyman: Londres, 1990.

TAYLOR, E. B.; STAMFORD, M. D.; BAXTER, J. S. Population subdivision in west slope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 10, p. 2609-2622, 2003.

THOMPSON, K. W. Citotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. **Copeia**, v. 4, n. 1, p. 679-691, 1979.

_____. Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces: Perciformes). **Experimentia**, v. 37, n. 1, p. 351-352, 1981.

TOLEDO, V.; FERRARI, I. Estudo citogenético em três espécies do Gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). **Cientifica**, v. 4, p. 101-106, 1976.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

VALLE JÚNIOR, R. F.; et al. Diagnóstico das áreas de preservação permanente na bacia hidrográfica do rio Tijuco, Ituiutaba-MG, utilizando tecnologia SIG. **Engenharia Agrícola**, p. 495-503, 2010.

VENCES, M.; et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2005.

VERVOOT, A. The karyotypes of seven species of *Tilapia* (Teleostei: Cichlidae). **Cytologia**, v. 45, n. 4, p. 651-656, 1980.

VICENTE, V. E.; et al. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G-and C-banding. **Genetica**, v. 119, n. 2, p. 115-120, 2003.

WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 1077-1085, 2008.

_____. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 1077-1085, 2009.

WELCOMME, R. L. The biology and ecology of the fishes of a small tropical stream. **Journal of Zoology**, v. 158, n. 4, p. 485-529, 1969.

WILLIS, S. C; et al. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 5, p. 1014-1030, 2010.

ZANE, L.; BARCELONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

CAPÍTULO II

Análise populacional de *Cichlasoma paranaense* (Osteichthyes, Perciformes, Cichlidae) da região do Triângulo Mineiro, Minas Gerias, com base em marcadores citogenéticos e DNA mitocondrial

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a energia hidráulica gera cerca de 90% de toda a eletricidade produzida no país. Os maiores potenciais remanescentes estão localizados em regiões com fortes restrições ambientais e distantes dos principais centros consumidores. Em 2004, a ANEEL estimou que pelo menos 50% da necessidade de expansão da capacidade de geração seria de origem hídrica (ANEEL, 2004).

Em maio de 2016, havia registro de 206 Usinas Hidrelétricas e 558 pequenas centrais hidrelétricas em operação no Brasil, e a sua maioria localizada na Bacia do Paraná (ANEEL, 2016). A região sudeste do Brasil apresentou forte crescimento industrial nas últimas décadas e para suprir a demanda energética decorrente desse crescimento, foram construídas diversas usinas hidrelétricas. As barragens provocam o impedimento do fluxo natural das águas dos rios e mudanças na diversidade de espécies de peixes (TUNDISI; TUNDISI, 2008) são consideradas fontes de impacto sobre os recursos pesqueiros e uma das principais ameaças à conservação de peixes de água doce (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008).

As barragens podem causar modificações no regime hidrológico, bloqueio de rotas migratórias de espécies, aprisionamento de nutrientes e diminuição da fertilidade de planícies (BEDORE; LOPES, 2008). Os peixes neotropicais têm sofrido grandes impactos, com a construção de reservatórios, descargas de efluentes agrícolas, domésticos e industriais nos rios (BARROCA, 2012). O ciclo biológico dessas espécies está relacionado aos ciclos hidrológicos dos rios, que também são alterados com o represamento, alterando a conectividade entre o rio e áreas de reprodução, além de interferir no estímulo para a desova (CAROSFELD et al. 2003). Consequências das barragens estão sendo documentadas no mundo todo (MORITA; YAMAMOTO, 2001; NERAAS; SPRUELL, 2001; HEGGENES; ROED, 2006; REID et al., 2008) e com isso são

imprescindíveis estudos para qualificar e quantificar esses impactos (BARROCA, 2012).

Diversos rios do estado de Minas Gerais foram modificados com a construção de barragens. Na região do Triângulo Mineiro, os Rios Araguari e Tijuco desaguam no Rio Paranaíba, que se encontra com o Rio Grande, formando o Rio Paraná. Dados da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2016) indicam que o Rio Paranaíba possui 4 Usinas Hidrelétricas (UHE), o Rio Araguari e Tijuco, afluentes da margem esquerda deste rio, possuem 4 UHEs e 1 Pequena Central Hidrelétrica (PCH), respectivamente, e o Rio Grande 13 UHEs. Os estudos das populações de peixes dessas regiões tornam-se relevantes, uma vez que a diversidade genética das populações está ameaçada, decorrente do isolamento físico provocado pelas barragens, que podem acarretar perda na variabilidade genética.

Os marcadores citogenéticos podem ajudar a caracterizar geneticamente diferentes populações de peixes afetadas por barragens. Análises citogenéticas e marcações cromossômicas como bandeamentos C, G e Ag-RONs (Marcação com prata das Regiões Organizadoras de Nucléolo), fluorocromos, sítios específicos e incorporação de análogos de bases do DNA, possibilitam encontrar e entender casos de polimorfismo cromossômico, restritos a determinadas localidades (KASAHARA, 2009). Marcadores moleculares podem contribuir de modo diferente para tais caracterizações populacionais, dependendo de suas características. Por exemplo, DNA mitocondrial, que tem sido o marcador molecular de diversidade animal mais utilizado ao longo das últimas três décadas (GALTIER et al., 2009). Essa ferramenta utiliza uma região do DNA mitocondrial como marcador genético universal capaz de identificar espécies animais de maneira padronizada, servindo como um código de barras de DNA, ou DNA *barcoding* (HEBERT et al., 2003; BLAXTER, 2004), por meio da utilização de um fragmento de 648 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).

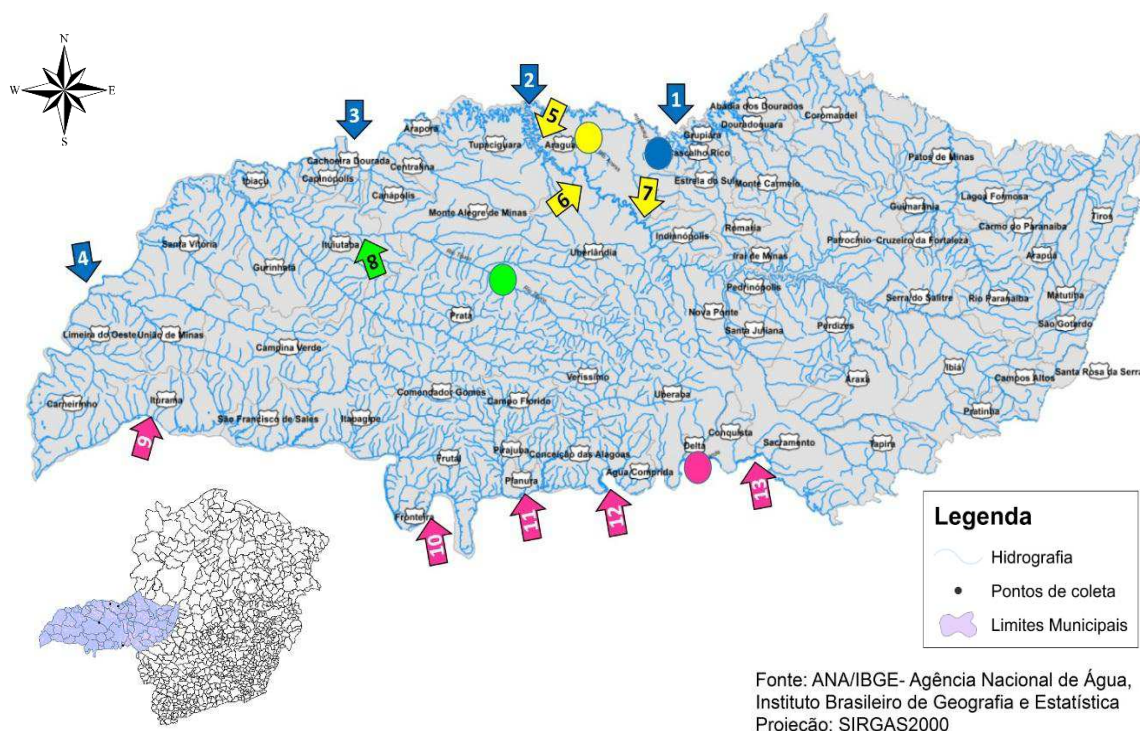
No presente trabalho, estudamos a espécie *Cichlasoma paranaense* (família Cichlidae) como modelo experimental. A família possui mais de 3.000 espécies (NELSON, 2006), é considerada um grupo monofilético (STREELMAN; KARL, 1997, SPARKS; SMITH, 2004) e está distribuída principalmente na América Latina, África e Madagascar (CHAKRABARTY, 2004, GENNER et al.,

2007). A espécie foi escolhida por ocorrer em diferentes UHEs e os marcadores citogenéticos escolhidos foram Ag-RONs, DAPI, Cromomicina e bandeamento C e um molecular foi o sequenciamento parcial da COI mitocondrial.) Assim, o objetivo foi avaliar se o tempo de implementação dessas barragens nos Rios Araguari, Tijuco, Paranaíba e Grande foi suficiente para afetar a variabilidade genética das populações desta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

Os espécimes foram coletados entre abril e agosto de 2015, nos Rios: Paranaíba (PAR) (18°22'47,65"S 48°23'10,57"W), Araguari (ARA) (18°52'20,67"S 48°04'42,53"W) (Córrego das Araras), Tijuco (TIJ) (18°56'47,29" S 49°01'47"W) e Grande (GRD) (19°59'14.73" S 47°47'19,35"W) como indicado na figura 1. O método utilizado para coleta foi a pesca com varas de bambu e os peixes foram levados vivos para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Uberlândia. Após a realização dos procedimentos necessários para obtenção dos tecidos para as análises citogenética e molecular, os espécimes foram fixados em álcool 70%, encaminhados para identificação pelo taxonomista Francisco Langeani e depositados no museu de Zoologia da Universidade Estadual Paulista em São José do Rio Preto.



Fonte: Adaptado autor, 2016.

Figura 1 Mapa do Triângulo Mineiro indicando os locais de coleta dos espécimes estudados. Em azul a população pertencente ao Rio Paranaíba; Amarelo: Rio Araguari; Verde: Rio Tijuco e rosa: Rio Grande. As setas representam as UHEs. 1. Emborcação; 2. Itumbiara; 3. Cachoeira Dourada; 4. São Simão; 5. Capim Branco II; 6. Capim Branco I; 7. Miranda; 8. PCH Salto Moraes; 9. Água Vermelha; 10. Marimondo; 11. Porto Colômbia; 12. Volta Grande; 13. Igarapava.

2.2 Caracterização Cariotípica

Quarenta e nove indivíduos foram submetidos à análise cariotípica: 14 (PAR); 14 (ARA), 08 (TIJ) e 13 (GRD). Foi injetada colchicina a 0,0125% na proporção de 1mL/100g do peixe e após 50 minutos os animais foram sacrificados imersos em aquários contendo benzocaína 94-09-7 (2 gramas por litro de água). Parte do rim foi retirada para obtenção de cromossomos mitóticos, utilizando a técnica de preparação direta (BERTOLLO et al., 1978). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) registrado com protocolo nº 108/14 (Anexo 1). Cerca de 350 metáfases por população foram observadas para determinação dos cariótipos. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964) em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subteloalocêntrico (st) e acrocêntrico (a). O número fundamental (NF) foi determinado de duas maneiras, na primeira (NF1) os cromossomos

metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos, enquanto que os subtelocêntricos e acrocêntricos corresponderam aos que possuem apenas um braço cromossômico, na segunda (NF2) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos, enquanto que os acrocêntricos foram considerados com apenas um braço cromossômico. Para detecção das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), foi utilizado a técnica descrita por Howell e Black (1980). A heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela técnica de banda C (SUMNER, 1972), as regiões ricas em adenina/timina e guanina/citosina foram evidenciadas pela coloração com fluorocromos DAPI (SHMID, 1980) e cromomicina (SCHWEIZER, 1980), respectivamente.

2.3 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento do Gene COI

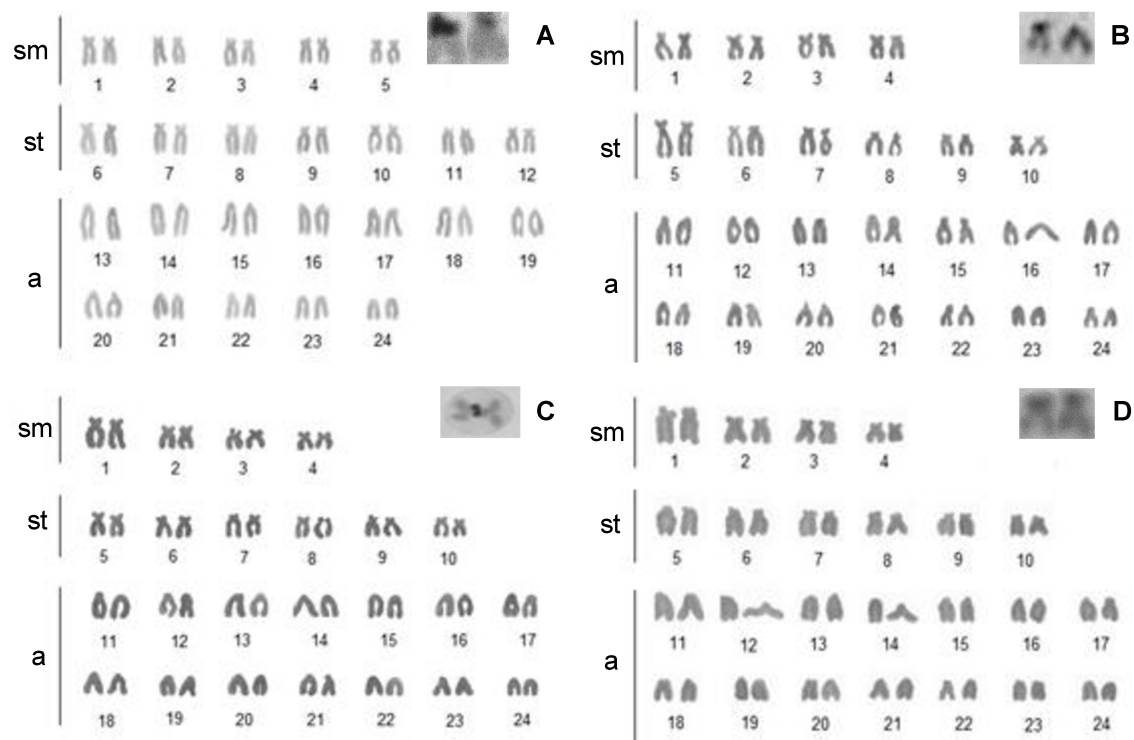
A extração de DNA foi realizada a partir de filamentos branquiais utilizando-se o método *High salt* (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). Para amplificação parcial do gene COI mitocondrial foi utilizado 150ng de DNA total e primers FishF2 (5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') e FishR1 (5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3') (WARD et al., 2005). As reações de PCR foram precedidas de um passo de desnaturação a 95°C por 8 minutos seguindo-se 35 ciclos de: desnaturação 95°C por 45 segundos, anelamento por 1 minuto e 20 segundos a 40°C, elongação a 68°C por 1 minuto. Ao final desses ciclos, um passo extra de elongação a 62°C por 5 minutos foi efetuado. Os produtos de PCR, 5µL de cada reação, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corados com Gel Red e as bandas foram visualizadas em transiluminador UV para quantificação preliminar dos mesmos para as reações de sequenciamento. As amostras foram tratadas com ExoSAP IT Cleanup® (Affymetrix®) e enviadas para a empresa *Myleus Biotechnology* onde foram submetidas à incorporação de nucleotídeos marcados pelo método *BigDye v 3.1* (*Life Technologies*) e submetidas a eletroforese capilar no equipamento ABI 3730 (*Life Technologies*). As sequências obtidas foram analisadas verificadas visualmente pela análise dos cromatogramas, alinhadas e traduzidas utilizando-se o software *Geneious V. 5.4*. As sequências foram identificadas como sendo

parte do gene COI de *Cichlasoma paranaense* pela utilização da plataforma *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). O software DNAsp 5.10.01 foi utilizado para as análises de diversidade haplotípica e nucleotídica (LIBRADO; ROZAS, 2009). O programa MEGA v 5.1 (TAMURA et al., 2011) foi utilizado para construir o fenograma de *Neighbor Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com 2000 repetições de “*bootstraps*” e também para o cálculo de distância genética entre as populações. O programa de GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para realização do teste de Mantel. E a rede de haplótipos foi construída usando-se o programa NETWORK 4.6.11 (www.fluxus-engineering.com).

3 RESULTADOS

3.1 Dados Citogenéticos

Foram analisados 49 espécimes de *C. paranaense* provenientes de populações do Rio Araguari, Tijuco e Paranaíba (Bacia do Rio Paranaíba) e Rio Grande (Bacia do Rio Grande). Das aproximadamente 1400 metáfases contadas nas 4 populações, 1100 possuem 48 cromossomos, as demais foram consideradas incompletas ou com *background*, 76,9% (ARA), 80% (TIJ), 83,3% (PIR) e 90% (GRD). Quanto ao número fundamental (NF) e a fórmula cariotípica a população do Rio Araguari, Tijuco e Grande apresentaram o mesmo valor (NF1 = 56; NF2 = 68 e Fórmula cariotípica: 8sm + 12st + 28a), porém a população do Rio Paranaíba mostrou-se divergente já que apresentou diferença na fórmula cariotípica com um par a mais de cromossomos submetacêntricos quando comparado às demais populações (NF1 = 58; NF2 = 72 e fórmula cariotípica: 10sm + 14st + 24a) como pode ser observado na figura 2.

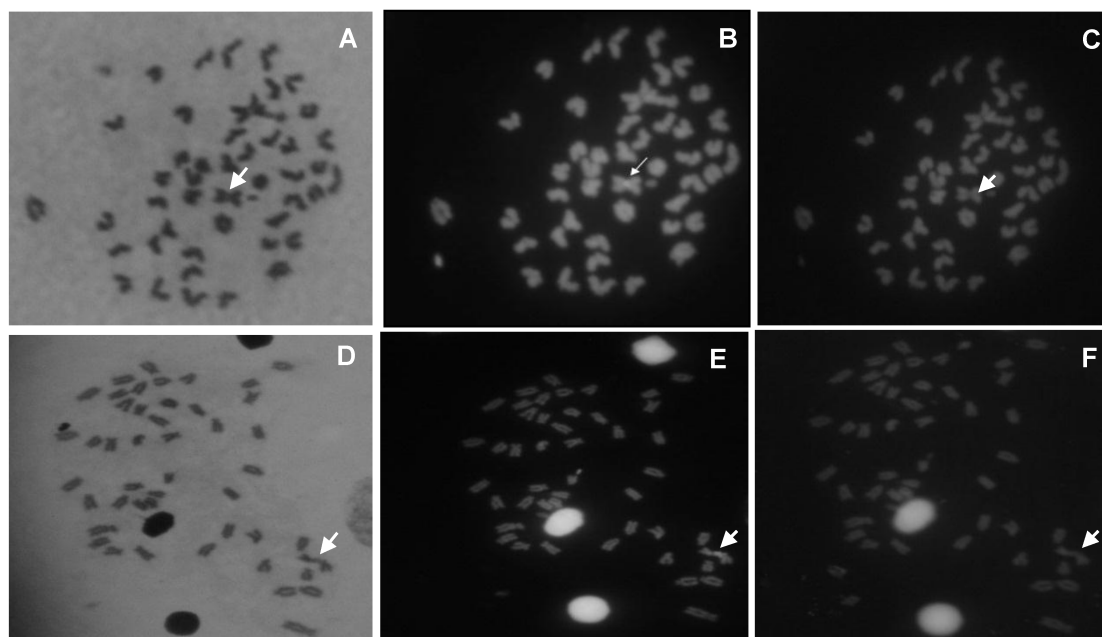


Fonte: Autor, 2016.

Figura 2. Cariótipo convencional de *C. paranaense* montado de acordo com nomenclatura proposta por Levan et al., 1964. Em destaque, o par submetido à técnica de impregnação com nitrato de prata, mostrando a RON na região telomérica do braço curto do 4º par cromossômico. **A.** População do Rio Paranaíba. **B.** População do Rio Tijucu. **C.** População do Rio Araguari. **D.** População do Rio Grande. sm: submetacêntrico, st: subtelocêntrico, a: acrocêntrico.

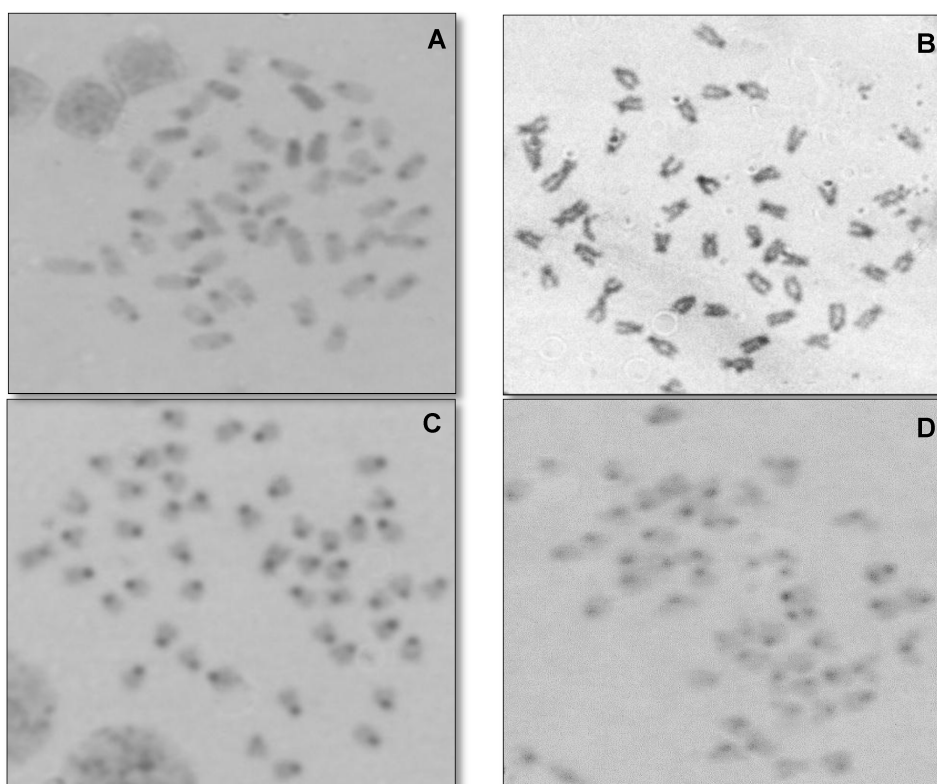
Foi encontrado um par cromossômico com marcação de nitrato de prata em cada uma das quatro populações, caracterizando as RONS como simples. Tais RONS apresentaram heteromorfismo no tamanho (Figura 2), como indicado nitidamente no par da população do Rio Paranaíba. Os fluorocromos base-específico marcaram cístrons ribossômicos positivamente e negativamente pela cromomicina e DAPI, respectivamente, associando-se às constrições secundárias coincidentes com as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONS) (figura 3).

O bandeamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos cromossomos das populações. Além disso, blocos adicionais foram encontrados como, na região telomérica de um par da população do Paranaíba e pares totalmente heterocromáticos na população do Rio Araguari e do Rio Paranaíba (Figura 4).



Fonte: Autor, 2016.

Figura 3. Metáfases submetidas à coloração com fluorocromos base-específico. **A, B e C.** População do Rio Araguari, a seta indica a constrição secundária encontrada; **B.** Indica a marcação positiva com a cromomicina; **C.** Indica a marcação negativa pelo DAPI. **D, E e F.** Indicam a população do Rio Paranaíba, sendo que, **D.** indica a constrição secundária encontrada; **E.** indica a marcação positiva com a cromomicina. **F.** indica a marcação negativa pelo DAPI.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 4. Metáfases de *C. paranaense* submetidas a técnica de bandeamento C, evidenciando regiões ricas em heterocromatina constitutiva. **A.** População do Rio Araguari. **B.** População do Rio Tijuco. **C.** População do Rio Paranaíba. **D.** População do Rio Grande.

3.2 DNA mitocondrial

Das 40 amostras analisadas, 10 pertenciam à população do Rio Paranaíba (PAR), 6 do Rio Tijuco (TIJ), 11 do Rio Araguari (ARA) e 13 do Rio Grande (GRD). Foram amplificados e sequenciados fragmentos de cerca de 600 pb a partir do gene COI mitocondrial. A partir do alinhamento de 157 pares de bases, foram identificadas seis mutações: quatro do tipo transição G-A, uma transição C-T e uma transversão A-T. Essas alterações totalizaram oito haplótipos diferentes com diversidade haplotípica de 66.3% e diversidade nucleotídica de 0.516%. Dentre os haplótipos, apenas o H2 e H3 são compartilhados entre as populações, o H2 está na população do Rios Grande e Paranaíba e o H3 nas populações do Rio Grande, Araguari e Tijuco e os demais são exclusivos de cada população como consta na tabela 1. As distâncias genéticas entre pares de populações podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 1. Distribuição dos haplótipos exclusivos e compartilhados entre as áreas analisadas.

HAPLÓTIPO	POPULAÇÃO
H1	PAR
H2	GRD, PAR
H3	ARA, GRD, TIJ
H4	PAR
H5	GRD
H6	TIJ
H7	GRD
H8	GRD

Fonte: Autor, 2016.

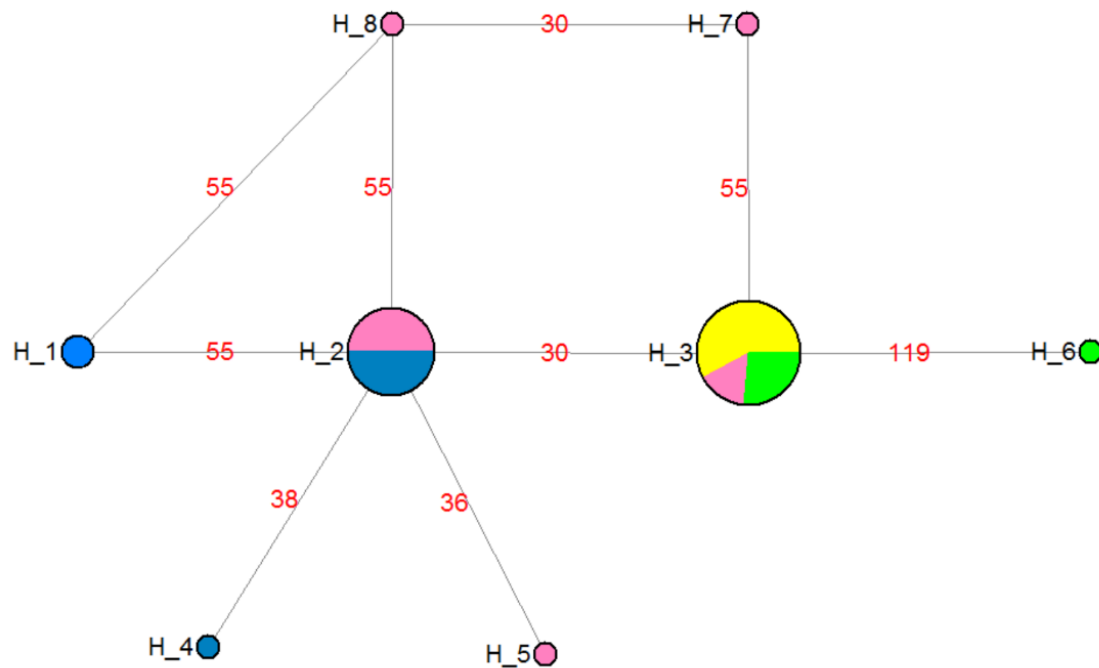
Tabela 2. Distâncias genéticas entre pares de populações (Kimura, 1980).

	PAR	ARA	GRD	TIJ
PAR	-			
ARA	0.008	-		
GRD	0.005	0.006	-	
TIJ	0.009	0.001	0.007	-

Fonte: Autor, 2016.

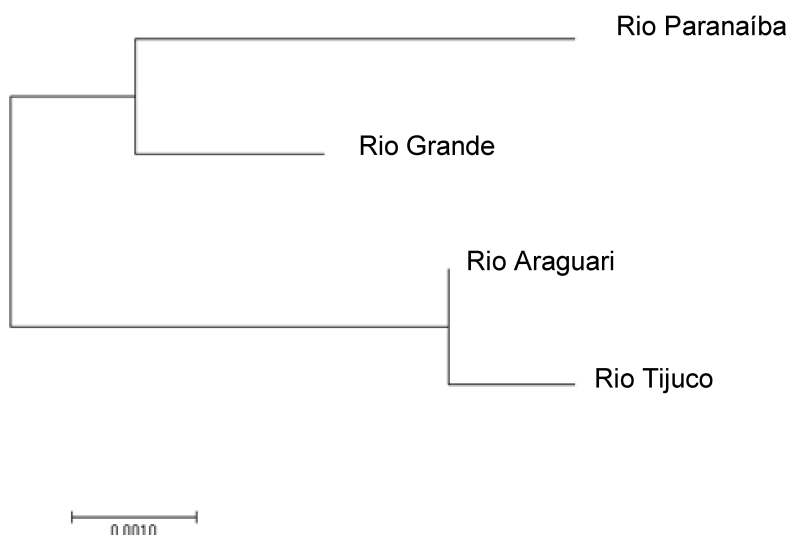
O haplótipo mais frequente foi o H3, compartilhado entre três áreas (Rio Araguari, Tijuco e Grande). Foi observado que a população do Rio Araguari não teve diversidade de haplótipos. Por outro lado, as populações do Rio Grande e do Rio Paranaíba compartilham 5 e 3 haplótipos, respectivamente. A população do Rio do Tijuco não compartilhou haplótipos do Paranaíba e apresenta um haplótipo exclusivo (H6). A população do Rio Araguari apresentou apenas o haplótipo 3, que é compartilhado com os Rios Tijuco e Grande. A população do Rio Paranaíba compartilhou haplótipo com o Rio Grande e possui dois

exclusivos, H1 e H4. Por fim, o Rio Grande não compartilhou haplótipos com o Rio Paranaíba apresentando H5, H7 e H8 exclusivos (Figura 5). As distâncias genéticas entre as populações (Tabela 2) foram utilizadas para a construção de um fenograma Neighbour-joining (SAITOU & NEI, 1987) (figura 6), que mostra a inter-relação entre as populações com base no compartilhamento ou não dos haplótipos.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 5. Rede de inter-relação haplotípica, em que as cores representam as áreas; os círculos os haplótipos; os tamanhos dos círculos a frequência do haplótipo. As linhas indicam as mutações e os números em vermelho nas linhas mostram a posição da mutação em relação ao haplótipo interligado. Azul: Rio Paranaíba; rosa: Rio Grande; amarelo: Rio Araguari e verde: Rio Tijucu.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 6. Fenograma de *Neighbor – Joining* relacionando pares de populações de *Cichlasoma paranaense* construído com base na distância genética calculada (KIMURA, 1980).

4 DISCUSSÃO

A bacia do Rio Paranaíba apresenta um total de dezesseis usinas hidrelétricas instaladas ao longo dos seus principais cursos d'água (figura 1) (MMA, 2007). Na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba são encontrados os maiores reservatórios, isolando partes dos rios. A longo prazo esses reservatórios podem afetar a estrutura populacional dos organismos aquáticos, mesmo com a utilização de corredores para a passagem de peixes, como foi observado em populações de *Squalius cephalus* pertencentes à bacia do Reno na Suíça (GOUSKOV et al., 2015).

Os dados citogenéticos referentes ao número e morfologia cromossômica ($2n$) das populações GRD, TIJ, ARA e PAR, corroboram o conservadorismo cariotípico dos ciclídeos neotropicais, apresentando em sua maioria cromossomos com $2n=48$ subtelo-acrocêntricos (MARTINS; PORTELLA-CASTRO; JULIO, 1995, LOUREIRO; CAETANO; DIAS, 2000, VICARI et al., 2006, MIZOGUCHI; CASTRO; SANTOS, 2007, PIRES; GIULIANO; DIAS, 2008). Porém, variações na fórmula cariotípica (FC) foram encontradas na população do Rio Paranaíba.

Os dados citogenéticos da espécie *C. paranaense* são escassos, sendo encontrados apenas para os estados de São Paulo e Paraná. A tabela 03

apresenta os dados disponíveis na literatura e pode ser visto que a FC neste caso está variando de acordo com as regiões. A variação na FC nas diferentes regiões pode ser decorrente de processos de inversões (em menor frequência) ao longo da evolução cariotípica das populações (GALETTI et al., 2006). Essas variações nas FC levam a divergências entre os autores no consenso do número fundamental. Estudos de pintura cromossômica tal como realizado em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (SCUDELER et al., 2015) podem futuramente elucidar quais tipos de rearranjos contribuíram para as diferenças observadas atualmente.

Apesar dos poucos dados, é possível visualizar que no estado de São Paulo a FC encontrada foi de 6 cromossomos meta-submetacêntricos, e na região do estado do Paraná, 20 cromossomos meta-submetacêntricos. Os dados em Minas Gerais foram diferentes apresentando FC com 8 (Rio Tijuco, Rio Araguari e Rio Grande) ou 10 (Rio Paranaíba) cromossomos submetacêntricos. Thompson (1979) considera que para os ciclídeos neotropicais o cariótipo ancestral é representado por $2n=48$ cromossomos acrocêntricos de modo que qualquer diferença desta condição representaria um estado derivado.

Tabela 3. Dados citogenéticos para a espécie de *Cichlasoma paranaense*. 2n. Número diploide. m. Metacêntrico; sm. Submetacêntrico; st. Subtelocêntrico; a. Acrocêntrico; RON. Região Organizadora de Nucléolo; PeriC. Pericentroméricas; Centrom. Centroméricas; NF. Número Fundamental. (NF 1 – São considerados cromossomos m e sm com dois braços, enquanto st e a, apenas um braço; NF 2 – m, sm e st são considerados com dois braços e os acrocêntricos com um braço).

Local	2n	Fórmula Cariotípica	NF1	NF2	Ag- RON	Distribuição da Heterocromatina		Referências	
						Padrão Geral	Blocos adicionais		
Córrego Carrapato, SP	48	6m/sm+42st/a	54	80	Simples	Centrom.		Poletto, 2009	
Córrego Batata, SP									
Córrego Faú, SP									
Rio Piquiri, PR		20m/sm+28st/a	68				Centrom.	Par RON	Lorscheider, Júlio, Margarido,2008
Bacia Rio Tibagi, PR							Centrom.		Loureiro, 1999
Rio Paraná, PR							PeriC.		Martins et al., 1995
Córrego Batata, SP		6m/sm+42st/a	74				Centrom.		Ribeiro, 2007
Córrego Faú, SP		6m/sm+42st/a							
Rio Paranaíba, MG		10sm+38st/a	58	72		PeriC	Par RON; Blocos adicionais	Autor, 2016	
Rio Tijuco, MG		8sm+40st/a	56	68		PeriC.	Blocos adicionais		
Rio Araguari, MG						PeriC			
Rio Grande, SP						PeriC.			

Fonte: Autor, 2016.

As análises de Ag-RONs mostraram apenas um par cromossômico carreador, o que é comum na família Cichlidae (FELDBERG; BERTOLLO, 1985, BRUM; NETO-FERREIRA; MOTA, 2002; VICARI et al, 2006, BENZAQUEM et. al., 2008, MIZOGUCHI; CASTRO; SANTOS, 2007), embora algumas espécies apresentem Ag-RONs múltiplas (MARTINS; PORTELLA-CASTRO; JULIO, 1995; SALGADO; FELDBERG; PORTO, 1995). Nas populações dos Rios Araguari e Paranaíba para a maioria dos indivíduos o par portador de Ag-RON mostrou variação no tamanho destas regiões. Diversas são as explicações para esse heteromorfismo no tamanho das Ag-RONs entre homólogos, podendo ser a ocorrência de translocações não recíprocas, duplicação em tandem de uma das regiões organizadoras de nucléolos, e permutas desiguais (MARKOVIC; WORTON; BERG, 1978), porém a explicação mais atual é que as variações no padrão de Ag-RONs podem ser decorrentes de atividade gênica diferencial, devido a diferente quantidade de unidades de transcrição e até ausência total de sequências de DNA ribossômico em um dos homólogos (KASAHARA, 2009). Contudo, para alguns autores o heteromorfismo encontrado nas Ag-RONs é comum em peixes (FORESTI et al, 1981; BRUM et al.; 1998; VICARI et al., 2006). Não foi possível determinar, com base nos marcadores utilizados, quais dessas hipóteses se aplicariam ao heteromorfismo observado nos peixes estudados. Análises de hibridação *in situ* fluorescente poderão futuramente esclarecer se tal diferença está relacionada com diferenças no número de cístrons em cada cromossomo do par carreador.

A heterocromatina constitutiva detectada pela técnica de banda C evidencia, em algumas espécies de peixes, a existência de blocos em diferentes quantidades, distribuídos principalmente nas regiões pericentroméricas/centroméricas/ teloméricas de cromossomos (GOLD et al., 1990) e menos frequentemente em regiões intersticiais (WEILER, WAKIMOTO, 1995; OLIVEIRA, WRIGHT, 1998). Em populações de *C. paranaense* do estado de São Paulo a distribuição da heterocromatina está preferencialmente na região pericentromérica (RIBEIRO, 2007), assim como observado nos peixes dos Rios Tijuco e Grande. Entretanto, blocos heterocromáticos intersticiais foram encontrados em populações de *C. paranaense* dos Rios Paranaíba e Araguari, e também associados às Ag-RONs em posição telomérica para indivíduos do Rio Paranaíba (figura 5), observado também em dois córregos do estado de São

Paulo (RIBEIRO, 2007). Tais diferenças de banda C podem ser usadas para ajudar na caracterização de populações, como observado em estudos com *Astyanax jacuhiensis*, no Rio Grande do Sul (MANTOVANI et al., 2000).

Variações na quantidade e na localização das bandas C indicam que eventos de duplicação e outros rearranjos são importantes durante o processo evolutivo da espécie, como foi observado na população do Rio Paraná, em Posadas, em que a espécie *Crenicichla lepidota* apresentou grandes blocos de heterocromatina (RONCATI; PASTORI; FENOCHIO, 2007). O tempo necessário para divergência cariotípica entre populações isoladas é incerto. Entretanto, já foi demonstrado que regiões heterocromáticas evoluem rapidamente, fazendo com que as sequências de bases de espécies altamente relacionadas sejam frequentemente muito distintas. Dessa forma, os mecanismos que mantêm os blocos heterocromáticos (variantes das proteínas HP1, por exemplo) podem também divergir e assim as populações se tornam geneticamente isoladas por vários mecanismos. Se estes mecanismos divergem de tal modo que a heterocromatina da população A já não pode ser mantida pelas proteínas de manutenção na população B, a própria sequência de bases contida na heterocromatina torna-se uma barreira ao fluxo gênico entre as populações (HUGHES; HAWLEY, 2009).

A figura 1 mostra por meio das setas onde estão implantadas as usinas e os locais de coleta dos peixes nos Rios Tijuco, Araguari, Paranaíba e Grande (pontos verde, amarelo, azul e rosa, respectivamente). A população PAR, a mais divergente citogeneticamente, foi coletada na represa da UHE de Itumbiara, a qual foi construída em 1974 e entrou em operação comercial em 1980. À montante do Rio Paranaíba há a UHE de Emborcação e são as UHEs mais antigas deste rio. A variação citogenética observada pode ser o indício que rearranjos cromossômicos estão ocorrendo e que as populações do Triângulo Mineiro podem estar divergindo isoladamente devido as barreiras ao fluxo gênico, impostas pela atividade humana, por meio da construção de barragens ao longo dos rios.

A técnica do DNA *barcoding* tem sido eficiente e frequente em estudos com peixes marinhos (WARD et al., 2005; RIBEIRO et al., 2012) e de água doce (HUBERT, et al., 2012; MEJÍA et al., 2012), tornando uma ferramenta importante em estudos populacionais, filogenéticos e biogeográficos entre espécies (AVISE

et al., 1987). Com esta técnica é possível identificar estruturação de populações, geralmente causada por processos de vicariância, que ocorrem quando populações são separadas por barreiras físicas e fazer estudo filogeográficos das populações nas áreas estudadas.

Com base nos dados de sequenciamento parcial do gene da citocromo oxidase I, um conjunto de 8 haplótipos foi gerado, como visto na figura 5. O haplótipo H3 foi o mais compartilhado, presente nas populações dos Rios Araguari, Grande e Tijuco. Por ser o mais frequente e também o mais compartilhado, H3 possivelmente é o haplótipo ancestral dentre os 8 que foram encontrados.

Na rede de haplótipos (figura 5) observa-se que o mais comum (H3) não foi observado na população PAR, a qual compartilha haplótipos com GRD, geograficamente distante. De fato, não houve correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas de acordo com o teste de Mantel ($R^2=0.02165$). A árvore de Neighbor – Joining apresentou o mesmo resultado.

A população do Rio Tijuco (figura 1, ponto verde) apresentou um haplótipo exclusivo (H6). Este é considerado um rio preservado e possui uma vasta diversidade ictiológica, fazendo parte da rota migratória de várias espécies, sendo que em época chuvosa, lagoas marginais são formadas e ocupadas como berçários (VALLE JÚNIOR et al., 2010). É considerado um rio de conservação onde não há UHEs, apenas uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH) de Salto Morais desde 1922, indicado pela seta verde. É possível que as barreiras físicas da PCH impediram que os peixes do Tijuco percorressem o fluxo d'água, fazendo com que sua população fosse ao longo do tempo se estruturando, justificando o fato de não possuir haplótipos compartilhados com PAR, no qual ele deságua. A população GRD foi a que apresentou o maior número de haplótipos exclusivos. Neste caso, a distância geográfica e o número de barragens ao longo do curso do rio podem justificar maior estruturação desta população.

Não foi possível inferir se o compartilhamento de haplótipos está ocorrendo por migração de indivíduos entre as áreas através de escadas de peixe, como observado em *Leporinus elongatus* no Complexo Canoas, Rio Paranapanema, Brasil (RAMOS et al., 2012), ou se o cenário observado de fato poderia ser enquadrado na categoria III de Avise (2000) em que a maioria dos haplótipos é estreitamente relacionada, ainda que estes estejam isolados

geograficamente, no caso pelas barragens. A explicação mais provável para tal padrão envolve fluxo gênico historicamente limitado entre populações em espécies não subdivididas por barreiras duradouras à dispersão. Assim, mutações recentes estariam confinadas a subgrupos na distribuição da espécie.

Ao analisar se há isolamento populacional ou não é necessário ressaltar fatores como: tamanho populacional, tamanho do fragmento e tempo em que as populações foram separadas (MARTELETO, 2011). Apesar das barragens nos rios estudados serem recentes, as distâncias genéticas calculadas (tabela 2) e o fenograma de Neighbor – Joining (figura 6) mostraram que as populações se dividiram em dois clados, em que, as populações dos Rios Grande e Paranaíba formaram um clado e as dos Rios Araguari e Tijuco outro clado. Estes dados mostram que existe leve estruturação das populações. O tamanho amostral pode ser um fator a ser considerado para o resultado observado, porém o esforço de captura foi intenso e verificamos que a espécie de fato não é muito abundante nos rios onde a água não está represada. Em relação ao tamanho do fragmento, estudos mostraram estruturação entre populações isoladas pertencentes a rios de pequeno porte (NERAAS; SPRUELL, 2001; MELDGAARD et al. 2003; LAROCHE; DURAND, 2004; NGUYEN et al. 2006 e NGUYEN 2008). Para o funcionamento de uma UHE é necessário que o curso do rio seja desviado, para formar um grande reservatório. A formação desse reservatório, que são as represas, afeta fortemente a fauna da região. A alteração da estruturação genética de uma população é maior quanto menor forem os fragmentos resultantes da introdução de barreiras e ainda, quanto maior o tempo de isolamento entre as populações estudadas mais sensível será o impacto na estrutura genética (MARTELETO, 2011)

A proximidade genética entre as populações GRD e PAR, geograficamente distantes, nos leva a sugerir o aprofundamento da investigação acerca da estruturação entre as populações analisadas. Dados da literatura mostram que populações isoladas por barragens podem não estar estruturadas geneticamente. Almeida, Sodré e Contel em 2003 analisaram a variabilidade genética da espécie *Pimelodus maculatus* nos Rios Tietê e Paranapanema no estado de São Paulo, Brasil. Apesar do Rio Tietê possuir nove usinas hidrelétricas, as subpopulações são geneticamente muito semelhantes, indicando que estes reservatórios provavelmente permitem a migração deste

peixe. Por outro lado, as populações do Rio Paranapanema apresentaram indicativos de estruturação entre subpopulações, indicando que existe diferenciação genética. Assim, acreditamos que o sequenciamento de outros genes do DNA mitocondrial (pois diferentes regiões do DNAm_t evoluem em taxas diferentes), o sequenciamento de genes nucleares bem como a análise de locos microssatélites permitirão a confirmação ou não dos dados preliminares obtidos no presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

Os dados citogenéticos de *C. paranaense* corroboram aos descritos na literatura para o conservadorismo da família Cichlidae em relação ao número cariotípico. Porém, diferenças encontradas nas marcações de bandeamento C, na fórmula cariotípica e na rede de haplótipos podem ser consequência do isolamento populacional imposto pela construção de barragens ao longo dos anos nestes rios. Outras regiões do DNAm_t e do DNA nuclear devem ser sequenciadas e novos marcadores devem ser empregados, como os microssatélites. Isto possibilitará identificar mais precisamente as relações genéticas entre as populações aqui estudadas, e possivelmente com populações de rios onde não há barragens, o que poderá auxiliar futuras ações de conservação nos rios do Triângulo Mineiro.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. A gestão de recursos pesqueiros em reservatórios no Brasil. In: *Ação Ambiental* (PRADO, J. S.). **Estratégias e desafios para a conservação de espécies nativas de peixes de Minas Gerais**. Viçosa: n. 39, 2008. Cap. 3, p. 10 -18.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. London: University of California Press, 2011.
- ALJANABI, S. M., MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, D. E.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers -Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 26, v. 3, n, 1, p. 301-305, 2003.
- ANEEL, 2004. **Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil)**. Disponível em: <[http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/04-Energia_Hidraulica\(2\).pdf](http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/04-Energia_Hidraulica(2).pdf)>. Acesso em: 12 maio 2016.
- ANEEL, 2016. **Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil)**. Disponível em: <<http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm>>. Acesso em: 12 maio 2016.
- AVISE, J. C.; et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**. United States of American, v. 18, n.1, p. 489-522, 1987.
- BARROCA, T. M. **Análise da variabilidade genética de *Prochilodus spp.* (Prochilodontidae) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis**. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 150 p., 2012.
- BEDORE, A. G.; LOPES, J. M. Peixamento como medida ambiental mitigadora do impacto na ictiouna. **Ação Ambiental**, v. 11, n. 39, p. 28-34. 2008.
- BENZAQUEM, D. C.; et al. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 250-255, 2008.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, p.103-120, 1978.
- BIOEDIT v. 5.0.6 HALL T. A. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, p. 95-98, 1999.
- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 669-679, 2004.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M. J. R.; WILSON A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 1, p. 1967-1971, 1979.

BRUM M. J. I., MURATORI C. F. M. L., LOPES P. R. D.; VIANNA P. R. G. A ictiofauna do sistema lagunar de Marica (RJ). *Acta Biol. Leopoldensia* v.16, p. 45-55, 1998.

BRUM, M. J., NETO FERREIRA, A.; MOTA, L. C. G. Análise cariotípica de *Crenicichla lacustris* (Perciformes, Cichlidae) do estado do Rio de Janeiro. (Abstract) p.97. In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. **Anais...** Maringá, Paraná, Brasil, 2002.

CAROLSFELD, J.; et al. **Migratory fishes of South America**. Canada: World Fisheries Trust, 2003.

CHAKRABARTY, P. Cichlids Biogeography: Comment and Review. **Fish and Fisheries**, v. 5, n. 2, p. 97–119, 2004.

DIAS, A. L.; GIULIANO CAETANO, L. **Citogenética de alguns grupos de peixes da bacia do rio Tibagi**. Londrina: Londrina, 2003.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia**, v. 38, n. 3-4, p. 319-324, 1985.

FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; TOLEDO FILHO S. A. (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer region in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

GALETTI JUNIOR, P. M.; et al. Assessing genetic diversity of Brazilian Reef Fishes by Chromosomal and DNA markers. **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 161–177, 2006.

GALTIER, N.; et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 22, p. 4541-4550, 2009.

GENNER, M. J.; et al. Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, n. 5, p. 1269–1282, 2007.

GOLD, J. R.; et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, n. 4, p. 563-575, 1990.

GOUSKOV, A. **Impacts of river fragmentation on the genetic population structure of the chub (*Squalius cephalus*)**. Tese de Doutorado. ETH-Zürich, 2016.

HEBERT, P. D. N.; et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, jan., 2003.

HEGGENES, J.; ROED, K. H. 2006. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*). Microgeographic differentiation in a fragmented river. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 15, n. 4, p. 366-375, 2006.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

HUBERT, N.; et al. Cryptic diversity in Indo-Pacific coral reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. 28-87, 2012.

HUBERT, N.; et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115-2136, 2007.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados** **Ribeirão Preto**. São Paulo: Editora SBG, 2009.

LAROCHE, J.; DURAND, J. D. Genetic structure of fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhône river: Zingel asper. **Heredity**, v. 92, n. 4, p. 329-334, 2004.

LEVAN, A.; FEDGA, K.; SOUBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LORSCHIEDER, C. A.; JÚLIO J. R., H. F.; MARGARIDO, V. P. **Estudos da coexistência de cinco espécies de Cichlidae (Ostariophysi, Perciformes) em simpatria no Rio Piquiri, Paraná, Brasil, através de uma abordagem citogenética**. Maringá, 2008.

LOUREIRO, M. A.; CAETANO, L. G.; DIAS, A. L. Cytogenetic *Nandopsis tetracanthum* (Pisces, Cichlidae) from Cuba. *Folia Zoologica*, v. characterization of two species of the genus *Crenicichla*. **Cytologia**, v. 65, n. 1, p. 57-63, 2000.

MANTOVANI, M.; et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, n. 3, p. 161-168, 2000.

MARKOVIC, D.; WORTON, R. G.; BERG, J. M. (1978). Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. **Human genetics**, v. 41, n. 2, p. 181-187, 1978.

MARTELETO, F. M. **Influência de barragens hidrelétricas sobre a estruturação genética de *Prochilodus spp* (Characiformes, Prochilodontidae) nas Bacias Hidrográficas do Rio Tocantins e do Rio São Francisco**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MARTINS I. C.; PORTELLA-CASTRO, A. L. B. JULIO Jr., H. F. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae Family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. **Cytologia**, v. 60, n. 3, p. 223-231, 1995.

MEJÍA, O.; LEON ROMERO, Y.; SOTO GALERA, E. DNA barcoding of the ichthyofauna of Pánuco–Tamesí complex: Evidence for taxonomic conflicts in some groups. **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 6, p. 471-476, 2012.

MELDGAARD, T.; NIELSEN, E. E.; LOESCHCKEL, V. Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. **Conservation Genetics**, v. 4, n. 6, p. 735-747, 2003.

MIZOGUCHI, S. M. H. K.; PORTELLA CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguaçu River. *Genetics and Molecular Research*, v. 6, n. 3, p. 650-656, 2007.

MMA, 2007. **Ministério do Meio Ambiente**. Recursos Hídricos no Brasil. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/cea/Rec_HidricosBR.pdf>. Acesso em: 12 maio 2016.

MORITA, K.; YAMAMOTO, S. 2001. Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. **Conservation Biology**, v. 5, n. 16, p. 1318-1326, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. New York: John Wiley & Sons, 2006.

NERAAS L. P.; SPRUELL P. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1153-1164, 2001.

NGUYEN, T. T. T. Population structure in the highly fragmented range of *Tor douronensis* (Cyprinidae) in Sarawak, Malaysia revealed by microsatellite DNA markers. **Freshwater Biology**, v. 53, n. 5, p. 924-934, 2008.

NGUYEN, T. T. T.; et al. Mitochondrial DNA diversity of broodstock of two indigenous mahseer species, *Tor tambroides* and *T. douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak, Malaysia. **Aquaculture**, v. 253, n. 1, p. 259-269, 2006.

OLIVEIRA, C., FORESTI, F., HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Research**, v. 6, n. 3, p. 205-211, 1998.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PIRES, L. B.; GIULIANO CAETANO, L.; DIAS, A. L. Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. **Caryologia**, v. 61, n. 2, p. 135-138, 2008.

POLETO, A. B. Citogenética comparativa de peixes da família Cichlidae / Andréia Benedita Poletto. – Botucatu: [s.n.], 2009. Tese (Doutorado em Biociência). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

RAMOS, J. V. B.; et al. Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex-Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 4, p. 821-828, 2012.

REID S. M., et al. Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 531-546, 2008.

RIBEIRO A. O, CAIRES R. A., MARIGUELA T. C., PEREIRA L. H. G., HANNER R., OLIVEIRA C. DNA barcodes identify marine fishes of Sao Paulo State, Brazil. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 6, p. 1012-1020, 2012.

RIBEIRO, H. B. **Estrutura e evolução cariotípica de peixes cichlídeos sul americanos**. 52f. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

RONCATI, H. A.; PASTORI, M. C.; FENOCHIO, A. S. Cytogenetic studies and evolutive considerations on fishes of the family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). **Cytologia**, v. 72, n. 4, p. 379-384, 2007.

SALGADO, S. M.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R. Estudos citogenéticos em cinco espécies da família Cichlidae (Perciformes-Labroidei), da bacia amazônica central. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 18, p. 463, 1995.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, n. 1, p. 83-103, 1980.

SCUDELER, P. E. S.; et al. Whole chromosome painting of B chromosomes of the red-eye tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **Comp. Cytogenet.**, v. 9, n. 4, p. 661-669, 2015.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.

SPARKS, J. S.; SMITH, W. L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes

(Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**, v. 20, n. 6, p. 501-517, 2004.

STREELMAN, J. T.; KARL, A. Reconstructing labroid evolution with single-copy nuclear DNA. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1384, p. 1011-1020, 1997.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

TAMURA, K.; et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, K. W. Citotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. **Copeia**, v. 4, p. 679-691, 1979.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

VALLE JÚNIOR, R. F., et al. Diagnóstico das áreas de preservação permanente na bacia hidrográfica do rio Tijuco, Ituiutaba-MG, utilizando tecnologia SIG. **Engenharia Agrícola**, p. 495-503, 2010.

VAWTER, L.; BROWN, W. M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science**, v. 234, n. 4773, p. 194-196, 1986.

VICARI, M. R.; et al. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 260-266, 2006.

WARD, R. D., et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WEILER, K. S.; WAKIMOTO, B. T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. **Annual review of genetics**, v. 29, n. 1, p. 577-605, 1995.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 108/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Análise citogenética e molecular de peixes da família Cichlidae, pertencentes a rios alterados devido a construção de usinas hidrelétricas no estado de Minas Gerais”, sob a responsabilidade da **Profª Drª Sandra Morelli** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **06 de fevereiro de 2015**.

(We certify that the protocol nº 108/14, about “Análise citogenética e molecular de peixes da família Cichlidae, pertencentes a rios alterados devido a construção de usinas hidrelétricas no estado de Minas Gerais” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 06/02/2015).

Uberlândia, 20 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

PROTOCOLOS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

Obtenção de Cromossomos Mitóticos

Técnica de preparação direta, adaptada por Bertollo et al. (1978), para estudos cromossômicos em peixes.

1. Injetar, intra-peritonalmente, colchicina a 0,0125% na proporção de 1mL/100g de peso do animal;
2. Deixar o peixe em um aquário bem aerado, por aproximadamente uma hora sacrificando-o;
3. Retirar o tecido desejado e lavar em solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M;
4. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro contendo 8 a 10mL de solução hipotônica;
5. Fragmentar bem o material, com auxílio de pinças de dissecação, completando-se este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando-se a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea;
6. Colocar a suspensão obtida durante 20 minutos na estufa a 36° - 37°C;
7. Suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, transferindo a suspensão obtida para um tubo de centrífuga;
8. Acrescentar aproximadamente 10 gotas de fixador (álcool metílico e ácido acético – 3:1) e suspender novamente o material;
9. Centrifugar por 10 minutos, a entre 500 a 900 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta de Pasteur;
10. Repetir o procedimento do item 8 e 9 duas vezes;
11. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 a 2mL de fixador, dependendo da quantidade de material e suspender bem o sedimento.

Coloração com Giemsa Convencional

1. Pingar 3 a 4 gotas da suspensão celular obtida, com uma pipeta de Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina devidamente limpa e seca;
2. Deixar escorrer o material e deixar secar ao ar;
3. Corar com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 10 minutos;

4. Deixar secar ao ar.

Deteção das Rons pela Impregnação com Nitrato De Prata (Ag-RONs)

Técnica descrita por Howell e Black (1980).

1. Colocar uma gota de solução de gelatina a 2% acrescida de ácido fórmico, na proporção de uma parte para 100 de solução e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de Prata a 50%, sobre lâmina preparada para cromossomos mitóticos;
2. Misturar as duas soluções e cobrir com lamínula;
3. Transferir para estufa a 60° C. Decorridos alguns minutos (5 a 6), a lâmina adquire uma coloração amarelada, passando para marrom dourada;
4. Remover a lamínula com água e lavar bem a lâmina em água deionizada;
5. Deixar secar ao ar.

Deteção da Heterocromatina Constitutiva – BANDA C

Técnica descrita por Sumner (1972) com algumas modificações.

1. Tratar a lâmina contendo os cromossomos mitóticos com uma solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, durante 15 minutos;
2. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
3. Submergir as lâminas numa cuba com 2 x 2xSSC por 15 minutos;
4. Lavar e secar ao ar;
5. Submergir as lâminas em um cuba com hidróxido de Bário a 5% por 01 a 30 minutos, a 41°C;
6. Lavar em solução de HCl 0,2N e em seguida em água deionizada e secar ao ar;
7. Incubar as lâminas numa solução salina de 2 2xSSC, aquecida por 45 minutos a 60°C;
8. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
9. Corar com Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 20 a 30 minutos;
10. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

Coloração com Cromomicina A₃

A técnica apresentada foi descrita por Schmid (1980), com modificações.

1. Colocar 100µl da solução de cromomicina A₃ (dissolver 0,5mg de cromomicina em 1mL de tampão McIlvaine e adicionar 5mM de cloreto de magnésio – deixar a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), com o auxílio de uma micropipeta, sobre a lâmina, cobri-la com uma

lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro;

2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 1 minuto e depois deixá-la em tampão McIlvaine por 5 minutos;

3. Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.

OBS: Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490nm (zona de excitação do azul).

Coloração DA-DAPI

Coloração com fluorocromo DAPI (4',6' – Diamidino – 2 - phenylidole), AT específico. Baseado no método de Schweizer (1980).

1. Colocar 150µl de solução de Distamicina 0,1mg/mL sobre cada lamina e cobrir com lamínulas, deixar por 15 min.

2. Escorrer a lamínula em tampão McIlvane e lavar a lamina com auxílio de uma pipeta Pasteur, em tampão McIlvane; secar levemente;

3. Mergulhar a lâmina em solução DAPI 0,3µg/mL, recém preparada, por 15 minutos, preferencialmente no escuro;

4. Lavar em tampão McIlvane, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de sacarose saturada.

Análises Cromossômicas

As melhores metáfases foram fotografadas com o auxílio de câmeras digitais e editadas com o software Adobe® Photoshop® CS5 *Extended version* 12.01. Os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e em seguida cada um foram medidos utilizando-se o software *Micro Measure version* 3.3. Os dados obtidos foram exportados Microsoft Excel 2007 para calcular a relação de braços (RB) de acordo com LEVAN et al., (1964). Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos, enquanto que os subtelocêntricos e acrocêntricos corresponderam aos que possuem apenas um braço cromossômico.