

TATIANE PIRES DE SOUSA



**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E DNA
BARCODE DE *Gymnotus* spp. (GYMNOTIFORMES:
GYMNOTIDAE) EXPLORADAS COMO ISCAS VIVAS NA
REGIÃO DE CORUMBÁ (MS)**

NOVA XAVANTINA-MT

2014

TATIANE PIRES DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E DNA
BARCODE DE *Gymnotus* spp. (GYMNOTIFORMES:
GYMNOTIDAE) EXPLORADAS COMO ISCAS VIVAS NA
REGIÃO DE CORUMBÁ (MS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Venere

Coorientadora: Dra. Karina de Cassia Faria

**NOVA XAVANTINA-MT
2014**

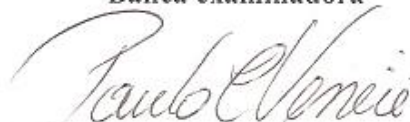
TATIANE PIRES DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E DNA BARCODE DE
Gymnotus spp. (GYMNOTIFORMES: GYMNOTIDAE)
EXPLORADAS COMO ISCAS VIVAS NA REGIÃO DE CORUMBÁ
(MS)**

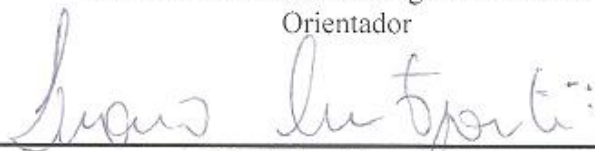
Dissertação julgada e aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação pela Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil.

Nova Xavantina, 30 de maio de 2014.

Banca examinadora



Dr. Paulo Cesar Venere
Universidade Federal de Mato Grosso
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Orientador



Dr. Liano Centofante
Universidade Federal de Mato Grosso
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Membro Titular



Dra. Elisângela Bellafronte da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso
Membro Titular

Dra. Débora Karla Silvestre
Embrapa Pantanal
Membro Suplente

**NOVA XAVANTINA-MT
2014**

S725c Sousa, Tatiane Pires de.

Caracterização cromossômica e DNA Barcode de *Gymnotus* spp. (Gymnotiformes: Gymnotidae) exploradas como iscas vivas na região de Corumbá (MS)/ Tatiane Pires de Sousa. Nova Xavantina: A Autora, 2014.

51 f.: il.

Orientador: Paulo Cesar Venere

Coorientadora: Karina de Cassia Faria

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014.

1. *Gymnotus* spp. 2. Cromossomos mitóticos. 3. citogenética. 4. Grupos taxonômicos. I. Título.

CDU – 575.316:639.31 (817.2)

Permitida a reprodução total ou parcial desde que citada a fonte.

A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância

(Félicité Robert de Lamennais)

*Aos meus pais, os maiores mestres da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de várias pessoas, às quais, expresso meu profundo agradecimento.

Sobretudo, agradeço a Deus pelo dom da vida e ao povo brasileiro por financiarem meus estudos.

Aos meus amados pais, Donizete e Maristela, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida, carinho e dedicação, por acreditarem em mim tornando possível a realização dos meus sonhos e pelos ensinamentos que me conduzirão por toda vida.

Agradeço à minha amada irmã Tatiele, pelo carinho, alegria dos poucos momentos de convivência, incentivo, aprendizado constante e paciência. Muito obrigada, minha amada família, por compartilharem todas as alegrias e tristezas da minha vida. Vocês são o meu suporte e o único tesouro que tenho! Amo muito vocês! E a todos familiares pelas palavras de incentivo.

Ao meu noivo Everton Silvério Leite por todo carinho, companheirismo, amor e paciência. Obrigado por existir na minha vida e fazer meus dias mais belos e alegres. Amo você.

Ao meu orientador Dr. Paulo Cesar Venere, meus sinceros agradecimentos por me acolher em seu laboratório, pela amizade, descontração, confiança, apoio, ensinamentos e contribuições ao longo deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Karina de Cassia Faria pela oportunidade, mas sobretudo, pela confiança depositada e ética profissional. Que Deus abençoe você e sua família, e mantenha seu espírito fraternal!

À Dra Débora Karla Silvestre Marques pela proposta do trabalho, garantia das coletas, disponibilização do material e pela parceria estabelecida.

Ao professor Dr. Fernando Rodrigues Pacheco pelo estágio concedido no laboratório de Genética e Biodiversidade, Universidade de Brasília.

Ao professor Dr. Claudio de Oliveira pelo estágio concedido no laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Universidade Estadual Paulista-Botucatu, SP.

Aos meus amigos de laboratório pelo convívio e alegria. Em especial, agradeço a equipe do GEPEMA pelo trabalho incessante e pela contribuição mesmo que indireta nesta caminhada.

A equipe do laboratório de Genética de Nova Xavantina-UNEMAT e aos amigos ali conquistados.

Agradeço a Carla de Andrade Vitorino pelas coletas, preparações citogenéticas, organização e montagem dos cariótipos, serenidade e calma ao longo deste trabalho.

À Renata Cristina Claudino de Oliveira pelos preciosos ensinamentos na biologia molecular e citogenética.

À minha amiga Samara Rayane pelo ombro amigo nos momentos de indecisão e de tristeza, pelos dias árduos e longos de trabalho e pelo companheirismo.

A querida Martinha Novotny, por me acolher em sua casa e me auxiliar no primórdio desta caminhada. Ao Lucas, ou melhor, Severino, que em muito ajudou nas dúvidas em citogenética se mostrando grande companheiro e amigo.

Aos professores do mestrado por compartilharem o conhecimento e experiência profissional.

À Universidade do Estado de Mato Grosso pela oportunidade de realização do curso, crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal de Mato Grosso, *campus* Universitário do Araguaia, onde se desenvolveu toda parte prática do presente trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Aos amigos do mestrado pelas longas noites de dedicação - principalmente em Estatística - descontração e parcerias. Muito obrigada pela amizade, em especial ao Sérgio Lopes, Jaqueline, Márcia Luiza e Carol.

As minhas amigas de república, em especial Adriana Mohr e Keila Nunes.

Aos animais que possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço a todos com quem tive a oportunidade de conviver por esses anos e que contribuíram em muito para que eu pudesse chegar até aqui.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1 Área de estudo e espécies coletadas.....	6
3.2 Estudos citogenéticos.....	7
3.3 Extração de DNA e ampliações.....	7
3.4 Análises dos dados.....	8
4. RESULTADOS.....	9
5. DISCUSSÃO.....	18
5.1 Aspectos citogenéticos.....	18
5.2 Aspectos moleculares.....	21
6. CONCLUSÃO.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
8. ANEXOS.....	34
8.1. Preparação de cromossomos mitóticos.....	34
8.2. Detecção das regiões organizadoras de Nucléolo (NORs e/ou RONS) – técnica de impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS):.....	35
8.3. Detecção de Heterocromatina Constitutiva (BC).....	36
8.4. Fluorocromos base-específico GC/AT – técnica de coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina A ₃ (CMA ₃) e DAPI.....	36
8.5. FISH DNAr 5S e 18S – <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>	37
8.5.1. Marcação da sonda.....	37
8.5.2. Preparação de lâminas.....	38
8.5.3. Mix de hibridação.....	38
8.5.4. Hibridação.....	38
8.5.5. 1xPBD (para 360ml).....	38
8.5.6. Lavagens pós-hibridação.....	39
8.5.7. Detecção e amplificação do sinal.....	39
8.6. Extração de DNA.....	39

RESUMO

Gymnotus está amplamente distribuído pelas bacias hidrográficas neotropicais e apresenta ampla diversidade cariotípica. Entretanto, essa diversidade não é acompanhada por variações morfológicas facilmente detectáveis, sugerindo a presença de espécies crípticas. A delimitação precisa de espécies crípticas, principalmente àquelas com número diploide igual a 54 cromossomos, utilizando-se apenas das técnicas de citogenética tem se mostrado pouco eficiente. Assim, a técnica do DNA *barcoding* vem se mostrando promissora na delimitação de espécies em diversos grupos taxonômicos. Diante disso, o presente trabalho analisou exemplares de *Gymnotus* spp. coletados no Rio Paraguai, no município de Corumbá, MS, com o objetivo precípuo de estimar quantas e quais são, de fato, as espécies exploradas comercialmente pelos isqueiros da região. Cromossomos mitóticos foram obtidos pela técnica de suspensão celular seguida de coloração com *Giemsa*, Banda C, AgRONS, fluorocromos base-específicos GC/AT e FISH com sondas para DNAr 18S e 5S. Os produtos de PCR para o gene COI foram purificados e sequenciados. De acordo com os marcadores cromossômicos, foram encontradas as espécies *G. sylvius*, *G. pantanal* e *G. cf. paraguensis*. *G. sylvius* apresentou número diploide com $2n=40$ cromossomos (36m-sm + 4st-a), *G. pantanal* apresentou fêmeas com $2n=40$ (14m-sm + 26 st-a) e os machos $2n=39$ cromossomos (14m-sm + 25st-a), confirmando um mecanismo de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. *G. cf. paraguensis* foi caracterizado com $2n=54$ cromossomos (50m-sm + 4st-a). A técnica de bandamento C revelou marcas centroméricas em praticamente todos os cromossomos nestas espécies, com poucos blocos distais e/ou intersticiais. Apenas um par de AgRONS foi identificado com nitrato de prata e confirmado pela FISH com sondas de DNAr 18S para todas as espécies. *G. sylvius* apresentou um par de cromossomos com sítios de DNAr 5S, *G. pantanal* apresentou dois pares de cromossomos marcados enquanto que *G. cf. paraguensis* apresentou cerca de 17 marcações para estes sítios. A coloração com o fluorocromo base específico CMA₃ revelou blocos de heterocromatina GC⁺ apenas nos pares correspondes às AgRONS. A coloração com DAPI não evidenciou regiões AT⁺ para nenhuma das espécies estudadas. A metodologia do DNA *barcoding* foi muito eficaz e corroborou na discriminação de três espécies entre os espécimes analisados (*G. cf. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal*). A divergência média K2P intraespecífica foi de 0.65%, valor 16 vezes menor ao encontrado entre as espécies congênicas (10.6%). Os procedimentos citogenéticos utilizados em conjunto com a técnica do DNA *barcoding* se mostraram eficientes na caracterização de *Gymnotus* spp. e confirmaram que a diversidade de espécies exploradas como iscas vivas está sendo subestimada na região.

Palavras-chave: citogenética, COI, peixes neotropicais, taxonomia.

ABSTRACT

Gymnotus is widely distributed among neotropical watersheds and provides extensive karyotype diversity. However, this diversity is not accompanied by easily detectable morphological changes, suggesting the presence of cryptic species. The precise delimitation of cryptic species, especially those with diploid number of $2n = 54$ chromosomes, using only the cytogenetic techniques have proved inefficient. Thus, the technique of DNA *barcoding* has proved promising in the delimitation of species in different taxonomic groups. Thus, the present study examined specimens of *Gymnotus* spp. collected in the Paraguay River, city of Corumbá, MS, with the primary objective of estimating how many and which are, in fact, the species commercially exploited by baiters in the region. Mitotic chromosomes were obtained by the technique of cell suspension followed by *Giemsa* staining, C Band, AgRONS, GC/AT and FISH base-specific fluorochromes with probes for 18S and 5S rDNA. The PCR products for the COI gene were purified and sequenced. According to the chromosomal markers, the species *G. sylvius*, *G. pantanal* and *G. cf. paraguensis*. *G. sylvius* showed diploid number of $2n = 40$ chromosomes (36m-sm + 4st - a), *G. pantanal* had females with $2n = 40$ (14m-sm + 26 st-a) and males $2n = 39$ chromosomes (14m-sm + 25st-a), confirming a mechanism of sex chromosome type $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. *G. cf. paraguensis* was characterized with $2n = 54$ chromosomes (50m - sm + 4st - a). The C-banding technique revealed centromeric bands in almost all chromosomes in these species, with few distal and/or interstitial blocks. Just a couple of AgRONS was identified with silver nitrate and confirmed by FISH with 18S rDNA probes for all species. *G. sylvius* presented a pair of chromosomes with 5S rDNA sites, *G. pantanal* presented two pairs of tagged chromosomes while *G. cf. paraguensis* showed about 17 tags for these sites. The staining with the CMA₃ base-specific fluorochrome revealed GC⁺ heterochromatin blocks only in pairs corresponding to the AgRONS. DAPI staining showed no AT⁺ regions for any of the species studied. The methodology of DNA *barcoding* has been very effective in discriminating between the three species specimens analyzed (*G. cf. paraguensis*, *G. sylvius* and *G. pantanal*). The mean intraspecific K2P divergence was 0.65 %, a value 16 times lower to that found among congeneric species (10.6 %). Cytogenetic procedures used combined with DNA *barcoding* technique proved effective in characterizing *Gymnotus* spp. and confirmed that the diversity of species exploited as live bait is being underestimated in the region.

Keywords: cytogenetics, COI, neotropical fish, taxonomy.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam mais da metade das espécies de vertebrados viventes (Nelson, 2006), com descrição estimada de 32800 espécies (Froese & Pauly, 2014). Segundo Lowe-McConnell (1999), as águas doces tropicais comportam mais de 40% das espécies de peixes, com uma riqueza estimada de 6025 espécies só na região neotropical (Reis *et al.*, 2003). Estes números vêm sofrendo crescente aumento, principalmente pela exploração de áreas de difícil acesso ou por revisões taxonômicas. Estimativas realizadas por Schaefer (1998, citado por Reis *et al.*, 2003) sugerem a existência de mais de 8000 espécies para esta região. Estas espécies estão distribuídas, majoritariamente em quatro grandes grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Perciformes, além de grupos menores como são os casos dos Cyprinodontiformes, Osteoglossiformes, Beloniformes, Tetraodontiformes, entre outros (Reis *et al.*, 2003; Lévêque *et al.*, 2008).

O território brasileiro é contemplado com uma grande rede de cursos d'água, detendo as maiores redes hidrográficas do mundo, sendo a bacia Amazônica a maior em área de drenagem, seguida pela bacia do rio Paraná. A bacia do Alto Rio Paraná é o principal contribuinte da bacia do Prata e o segundo em extensão da América do Sul, abrangendo vários estados brasileiros (Agostinho & Júlio Jr., 1999). A bacia do rio Paraguai também é considerada uma das bacias hidrográficas mais importantes do Brasil, representando uma das doze regiões hidrográficas do país. Sua área total tem cerca de 1.100.000 km² e abrange áreas dos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul bem como três países vizinhos: Argentina, Paraguai e Bolívia (Carvalho 1986; Santiago 2014).

O rio Paraguai é o principal rio deste conjunto, nasce em território brasileiro, na Chapada dos Parecis no estado de Mato Grosso e tem sua foz no rio Paraná. A principal característica dessa importante bacia hidrográfica é a grande região pantaneira, um complexo de ecossistema formado por uma combinação de várias planícies, cujas extensas áreas permanecem submersas por inundação fluvial ou alagamento decorrente de chuvas e da elevação do lençol freático (Santos, 2012). Assim, a diferença no nível das águas entre as estações de chuva e seca podem resultar no alagamento de toda a região do Pantanal (Suganuma, 2008). Estes pulsos de inundação, além de representarem o principal fator ecológico também regulam a produtividade pesqueira,

fazendo da pesca uma atividade socioeconômica muito importante (Junk & Cunha, 2005).

Atualmente, a pesca no Pantanal é realizada nas modalidades de subsistência, profissional-artesanal e amadora. A Lei 3.886 de 28 de abril de 2010 preconiza que a pesca de subsistência é aquela exercida por pescador profissional artesanal ou ribeirinho desembarcado ou em barco a remo e sem motor, utilizando somente caniço simples, linha de mão e anzol, na qual o peixe não pode ser comercializado. Segundo Catella *et al.* (2008), a pesca de subsistência é uma importante fonte proteica às famílias ribeirinhas ou de regiões isoladas. A pesca profissional artesanal é baseada na comercialização e consumo humano, e ainda na captura de iscas vivas. Já a pesca amadora visa atender as demandas do turismo pesqueiro, sendo o peixe o atrativo principal que não pode ser comercializado (Catella, 2004, 2007). Para a normatização da atividade, a legislação estadual e federal seguem políticas conservadoras no estado de Mato Grosso do Sul (Welcomme, 1986; Catella *et al.*, 1997), como o uso de petrechos e o tamanho mínimo permitido para captura de peixes.

Segundo Britski *et al.* (1999, 2007), a ictiofauna pantaneira é muito diversa e está distribuída entre as seguintes ordens: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Perciformes, Cyprinodontiformes, Rajiformes, Lepidosireniformes, Clupeiformes, Beloniformes, Synbranchiformes e Pleuronectiformes perfazendo um total de 269 espécies de peixes. Nesse conjunto de espécies merecem destaque os peixes da ordem Gymnotiformes, que apresentam características ímpares quanto a sua morfologia em relação aos demais peixes neotropicais.

Essa distinção morfológica é, em parte, atribuída ao corpo alongado e lateralmente comprimido, ausência das nadadeiras dorsal e pélvica, nadadeira anal longa com movimentos ondulatórios, responsável pela locomoção dos indivíduos para frente e para trás, nadadeira caudal ausente ou muito reduzida (Mago-Leccia, 1994; Britski *et al.*, 1999, 2007; Santos *et al.*, 2004) e, principalmente, por emitirem e detectarem sinais elétricos (Lovejoy *et al.*, 2010; Crampton *et al.*, 2013).

Estes caracteres morfofisiológicos associados à coloração e ao padrão de listras são fatores considerados determinantes para a taxonomia do grupo. Segundo Mago-Leccia (1994) a taxonomia deste grupo de peixes neotropicais é dificultada principalmente pela capacidade biológica de regeneração tecidual. As cicatrizes

formadas pelo processo de regeneração levam a modificações na morfologia dos indivíduos, principalmente na região posterior do corpo, um atributo muito utilizado na taxonomia (Baroni, 2010).

Dentre as cinco famílias desta ordem (Santos *et al.*, 2004), Gymnotidae compreende os peixes comumente conhecidos como tuviras, sarapós e ituís. Nesta família estão incluídos atualmente os gêneros *Gymnotus* Linnaeus, 1758 e *Electrophorus* Gill, 1864 (Campos-da-Paz, 2003). No Pantanal sul Mato-Grossense, os *Gymnotus* são de importância socioeconômica por corresponderem ao principal produto do comércio de iscas vivas.

Segundo Albert *et al.* (2005), as espécies destes gêneros estão distribuídas desde o sul do México até porções situadas ao norte da Argentina. Eles apresentam sinais elétricos em pulsos fracos (*Gymnotus*) ou bastante fortes (*Electrophorus*), para a localização de objetos ou presas na escuridão e para a comunicação (Rodríguez-Cattaneo *et al.*, 2008). Estas características contribuíram em muito para o sucesso do grupo nos ecossistemas aquáticos neotropicais (Crampton & Albert, 2006).

Segundo Milhomem *et al.* (2007) o gênero *Gymnotus* vem sendo o mais investigado dentre os Gymnotiformes quanto aos aspectos citogenéticos, elevando o número de nove (Mago-Leccia, 1994) para 37 espécies descritas (Milhomem *et al.*, 2012b). Os resultados encontrados vêm revelando uma ampla diversidade cariotípica, com números diploides variando de $2n=34$ em *G. capanema* (Milhomem *et al.*, 2012b) a 54 cromossomos em *G. carapo*, *G. mamiraua*, *G. paraguensis* e *G. inaequilabiatus* (Fernades-Matioli *et al.*, 1998; Margarido *et al.*, 2007; Milhomem *et al.*, 2007; Scacchetti *et al.*, 2011).

No entanto, *G. inaequilabiatus* teve seu cariótipo descrito por Fernades-Matioli *et al.* (1998) com número diploide de $2n=52$ cromossomos e por Scacchetti *et al.* (2011) com 54 cromossomos. Em ambos os trabalhos, os espécimes foram coletados na bacia do rio Paraná no estado de São Paulo. Tal variação pode ter distintos significados, ou seja, os espécimes estudados não pertencem a uma mesma unidade taxonômica e foram erroneamente identificados como tal, ou são, de fato pertencentes a uma mesma espécie, porém apresentando variação numérica intraespecífica em seus cariótipos. Sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ também podem ser observados

(Silva & Margarido, 2005), como é o caso de *G. pantanal* com fêmeas apresentando 40 cromossomos e machos 39 (Fernandes *et al.*, 2005; Margarido *et al.*, 2007).

Segundo Bertollo *et al.* (1986), a citogenética associada com a taxonomia permitiu o entendimento de aspectos taxonômicos de alguns peixes neotropicais, principalmente de grupos taxonomicamente mal definidos. Neste tipo de estudo, vem sendo comumente empregadas as técnicas convencionais de citogenética como a coloração com *Giemsa*, bandamento C, impregnação pelo nitrato de prata das regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) e o uso de fluorocromos base-específicos (CMA₃, DAPI, etc). Devido a suas particularidades, as diferentes colorações evidenciam a constituição cromossômica de uma espécie permitindo comparações interespecíficas e populacionais.

Marcadores específicos de DNA (sondas de DNA) têm sido amplamente utilizados em estudos cromossômicos de peixes, principalmente os genes ribossomais 5S e 18S (Artoni *et al.*, 2000; Tenório, 2012). Essas regiões podem ser mapeadas nos cromossomos com auxílio de sondas específicas pela técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Devido à variabilidade em relação a sua localização nos cromossomos, essas sequências têm sido fortemente empregadas como marcadores citogenéticos específicos (Martins & Galetti, 2001b), promovendo uma revolução nos estudos de vários grupos de peixes.

Devido às dificuldades encontradas na determinação segura de espécies crípticas, outras técnicas vêm surgindo a fim de aumentar a confiabilidade de identificação. Assim, Hebert *et al.* (2003) propôs o código de barras de DNA ou DNA *barcoding* como metodologia padronizada na delimitação de espécies. Essa técnica utiliza-se de um pequeno fragmento de DNA mitocondrial (DNAmt) como identificador único de espécies já descritas e na descoberta de novas espécies.

Distintos trabalhos apontam a eficácia deste marcador na delimitação de espécies (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 2007, 2009; Clare *et al.*, 2007, 2011; Hubert *et al.*, 2008; Casiraghi *et al.*, 2010) e na popularização desta abordagem (Marques *et al.*, 2013). Pereira *et al.* (2013), com base na metodologia do DNA *barcoding* identificou 99,2% das espécies de peixes analisadas na bacia do Alto rio Paraná. Carvalho *et al.* (2011a), ao estudar a fauna de peixes do rio São Francisco também pôde observar aspectos relacionados a diversificação da fauna

relacionando-a com a história filogeográfica, além de destacar identificações errôneas e ampliar a distribuição de espécies conhecidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo

Atualmente a Resolução nº 22 de 25 de agosto de 2011 da SEMAC/MS considera que são comercializadas como iscas vivas as espécies *G. inaequilabiatus* e *G. paraguensis*. Assim, tendo em vista que estudos preliminares realizados no município de Corumbá (MS) sugerem a existência de pelo menos três espécies de tuviras comercializadas na região (Marques & Calheiros, 2013), o presente trabalho objetivou caracterizar, com base em marcadores cromossômicos e moleculares, as possíveis espécies de *Gymnotus* exploradas pelos ribeirinhos como iscas vivas na região de Corumbá, MS, no médio Rio Paraguai.

2.2 Objetivos específicos

- a. Caracterizar cariotipicamente as possíveis espécies de *Gymnotus* spp. por coloração convencional com *Giemsa*, banda C e AgRONS;
- b. Identificar as regiões cromossômicas ricas em pares de base GC e AT pela coloração fluorocromo base-específicos CMA₃ e DAPI;
- c. Mapear as regiões específicas de DNAr 5S e 18S nas prováveis espécies em questão, por hibridação “*in situ*” fluorescente;
- d. Ampliar e padronizar o uso do gene COI como identificador e discriminador de espécies crípticas, notadamente as espécies de *Gymnotus* da área eleita para o presente estudo;
- e. Analisar os padrões de diversidade genética interespecífica de *Gymnotus* spp. com base neste marcador mitocondrial;
- f. Disponibilizar essas informações no sentido de se fomentar a criação de estratégias de manejo e conservação para as espécies de Gymnotiformes sul Mato-Grossenses exploradas como iscas vivas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e espécies coletadas

Um total de 78 exemplares de peixes *Gymnotus* spp., comercializados como iscas vivas, foi coletado na bacia do Rio Paraguai no Pantanal sul Mato-Grossense (Fig. 1), nas proximidades do município de Corumbá, MS, nas seguintes localidades: (1) Rio São Lourenço – coordenadas 17°50'53,6''S 57°23'30,3''O; (2) na região a jusante da confluência entre o Rio São Lourenço e Paraguai – coordenadas 17°54'48,83''S 57°27'39,13''O; (3) Rio Paraguai, a montante da confluência com o Rio São Lourenço – coordenadas 17° 51' 37,9" S 57° 31' 11,1"O.

Após as coletas, os peixes foram transportados vivos para o Laboratório de Peixes EMBRAPA-PANTANAL e acondicionados em aquários bem aerados, por 24 horas. Após esse período, foram realizadas as técnicas usuais de obtenção cromossômica destes animais.

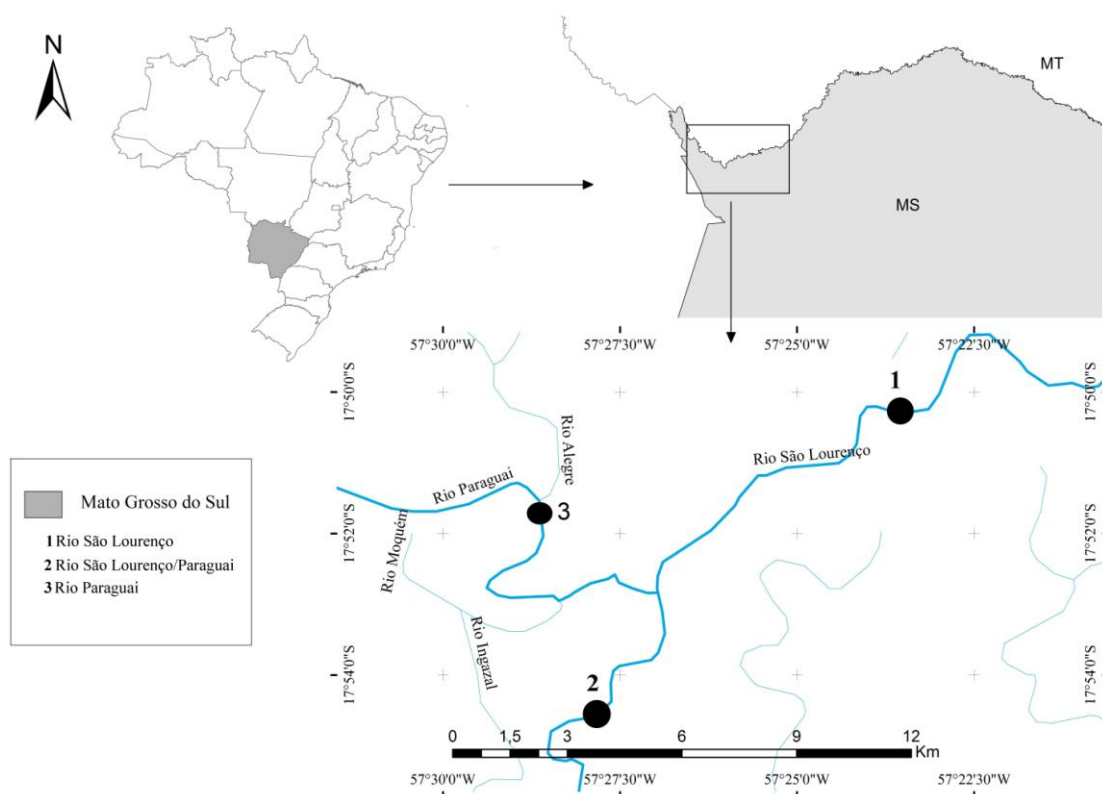


Fig. 1. Locais de coleta das espécies de *Gymnotus*, no Rio São Lourenço (1), no Rio Paraguai, à jusante da confluência com o Rio São Lourenço (2) e no Rio Paraguai, à montante da confluência (3).

3.2 Estudos citogenéticos

Para obtenção de cromossomos mitóticos foi seguida a metodologia de suspensão celular inicialmente descrita para estudos cromossômicos de vertebrados superiores (Egozcue, 1971) adaptada para estudos cromossômicos em peixes por Bertollo (1978). Com base no protocolo de Howell & Black (1980) foi realizada a localização das regiões organizadoras de nucléolo pela técnica de impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS). Para obtenção do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva seguiu-se a técnica de Summer (1972) com ajustes no cotidiano do laboratório. Para a análise das regiões ricas em pares de base GC/AT (Cromomicina A₃/DAPI), seguiu-se as técnicas descritas por Schweizer (1976, 1980). Para procedimento de citogenética molecular, utilizou-se a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência com sondas de DNAr 5S e 18S dos próprios espécimes, seguindo Pinkel *et al.* (1986) com modificações sugeridas por Martins & Galetti (2001a).

Dentre os espécimes estudados, o número diploide modal de cromossomos foi determinado por contagem de 30 metáfases em cada lâmina/indivíduo. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX51 com sistema de captura digital de alta resolução. Para montagem e organização dos cariótipos seguiu-se a classificação sugerida por Levan *et al.* (1964) ajustado para cariótipos de peixes que consiste em arranjar os cromossomos de acordo com uma relação de tamanhos de braços (RB), dispostos em ordem decrescente como metacêntrico (RB=1,00 a 1,70), submetacêntrico (RB=1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB=3,01 a 7,00) e acrocêntrico (RB \geq 7,01) sob as seguintes abreviações: m, sm, st e a, respectivamente. A montagem do cariótipo foi realizada com auxílio de programa editor de imagem Adobe Photoshop 7.0.

3.3 Extração de DNA e ampliações

O DNA genômico foi extraído de suspensão celular refrigerada -20 °C seguindo o protocolo de Aljanabi & Martinez (1997). As regiões para o gene COI, 18S e 5S foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando respectivamente, os seguintes *primers*: COI FishF1 5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC3', COI FishR1 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA3' (Ward *et al.*, 2005), 18S NS1 5'GTA GTC ATA TGC TTG TCT C3', 18S NS2 5'GGC

TGC TGG CAC CAG ACT TGC3' (White *et al.*, 1990), 5S A 5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC3', 5S B 5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC3' (Martins & Galetti, 1999). As reações foram realizadas a um volume total de 25µl numa concentração final de 1.5mM de MgCl₂ (50mM), 0.20µM de cada *primer*, 0.04mM de dNTPs mix (dGTP, dCTP, dATP, dTTP), 1U de *Taq* DNA Polimerase, 1X de tampão enzimático (10X), DNA genômico e água MiliQ.

Todas as reações foram realizadas em Termociclador Biocycler (Eppendorf), com temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de 94°C por 45s, 52°C por 1min, 72°C por 1min, e para extensão final de 5min a 72°C; temperatura de desnaturação de 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 1min, 72°C por 5min e extensão final de 72° por 5min; desnaturação de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45s, 60°C por 1min, 72°C por 1min, extensão final de 72°C por 5min, para amplificação dos genes COI, 18S e 5S respectivamente.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1.5% solubilizado em tampão TBE 0.5x e visualizados em luz ultravioleta. Utilizou-se o marcador molecular *ladder* de 100pb (AMRESCO) para estimar o tamanho dos produtos obtidos. O produto de PCR do gene COI foi sequenciado seguindo a técnica de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) e será disponibilizado para futuras comparações através do *National Center for Biotechnology Information* (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os produtos de PCR para o gene 18S e 5S seguiram para a hidridação *in situ* por fluorescência (FISH).

3.4 Análises dos dados

O software BioEdit (Hall, 1999) foi utilizado para analisar a qualidade do sequenciamento do DNAm e para realizar o alinhamento múltiplo das sequências através da ferramenta Clustal W. Após o alinhamento, as sequencias foram editadas e utilizadas nas análises posteriores. No programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), as sequencias do gene *citocromo oxidase subunidade I* (COI) foram analisadas utilizando método *neighbour-joining* (NJ), utilizando o modelo K2P com suporte de 1000 replicações de *bootstrap*. Matriz de distância genética entre as amostras foram também obtidas usando o modelo K2P, o que forneceu a distância média intra e interespecífica.

A sequência parcial do gene COI de *Gymnotus inaequilabiatus* foi utilizado como grupo externo nas análises.

4. RESULTADOS

Dentre os 78 exemplares analisados, foram observados 39 indivíduos com número diploide modal de $2n=54$ (50m-sm+4st-a), 10 indivíduos com $2n=40$ (36m-sm+4st-a) e 29 indivíduos com $2n=39/40$ (15m-sm+24st-a para machos e 14m-sm+26st-a para fêmeas) cromossomos. De acordo com a literatura, trata-se desta forma, das espécies *Gymnotus*. cf. *paraguensis* (Fig. 2A), *Gymnotus sylvius* (Fig. 3A) e *Gymnotus pantanal* (Fig. 4A), respectivamente.

O bandamento C (BC) revelou a ocorrência de blocos heterocromáticos na região centromérica de todos os cromossomos de *G.* cf. *paraguensis*, além de blocos pericentroméricos nos pares n.^{os} 5 e 6, na região intersticial no par n.^o 7 e na porção terminal do braço curto do cromossomo n.^o 1 (Fig. 2B). *G. sylvius* apresentou padrão de heterocromatina constitutiva pericentromérica nos cromossomos dos pares n.^{os} 1, 8, 13 e 14, na região intersticial do par cromossômico n.^o 18, ao longo do braço curto dos cromossomos n.^{os} 9, 10, 11 e 20 (Fig. 3B). O padrão de heterocromatina constitutiva em *G. pantanal* revelou blocos heterocromáticos centroméricos em 16 pares cromossômicos e ao longo do braço curto do par n.^o 16 (Fig. 4B).

As regiões organizadoras de nucléolo obtidas pela impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) foram visualizadas na porção intersticial do braço curto do par de cromossomos metacêntricos número 1 em *G.* cf. *paraguensis* (destaque na Fig. 2B), ao longo do braço curto do par de cromossomos subtelocêntricos número 20 em *G. sylvius* (destaque na Fig. 3B) e ao longo do braço curto do par de cromossomos subtelocêntricos número 16 em *G. pantanal* (destaque na Fig. 4B).

O uso de sondas de DNAr 18S confirmou os resultados obtidos na coloração pelo nitrato de prata (AgRONS), enquanto que a hibridação com sondas de DNAr 5S demonstrou várias marcações para a localização deste gene com cerca de 17 pares cromossômicos em *G.* cf. *paraguensis*, na região pericentromérica do par número 4 em *G. sylvius* e nos pares número 3 e 5 em *G. pantanal* (Fig. 5). A coloração com o fluorocromo AT específico DAPI não evidenciou coloração preferencial por nenhum segmento, com exceção das constrições secundárias que surgem como porções mais

escuras (DAPI negativas) (Fig. 6A, C e E). Por outro lado, a coloração com CMA₃ revelou blocos de heterocromatina GC⁺ na região intersticial do par cromossômico n.º 1 em *G. cf. paraguensis*, ao longo do braço curto do cromossomo n.º 20 em *G. sylvius* e ao longo do braço curto do cromossomo n.º 16 em representantes de *G. pantanal*, marcando apenas o par corresponde a AgRONS (Fig. 6 B, D e F). Marcas adicionais pouco evidentes foram observadas em *G. sylvius*.

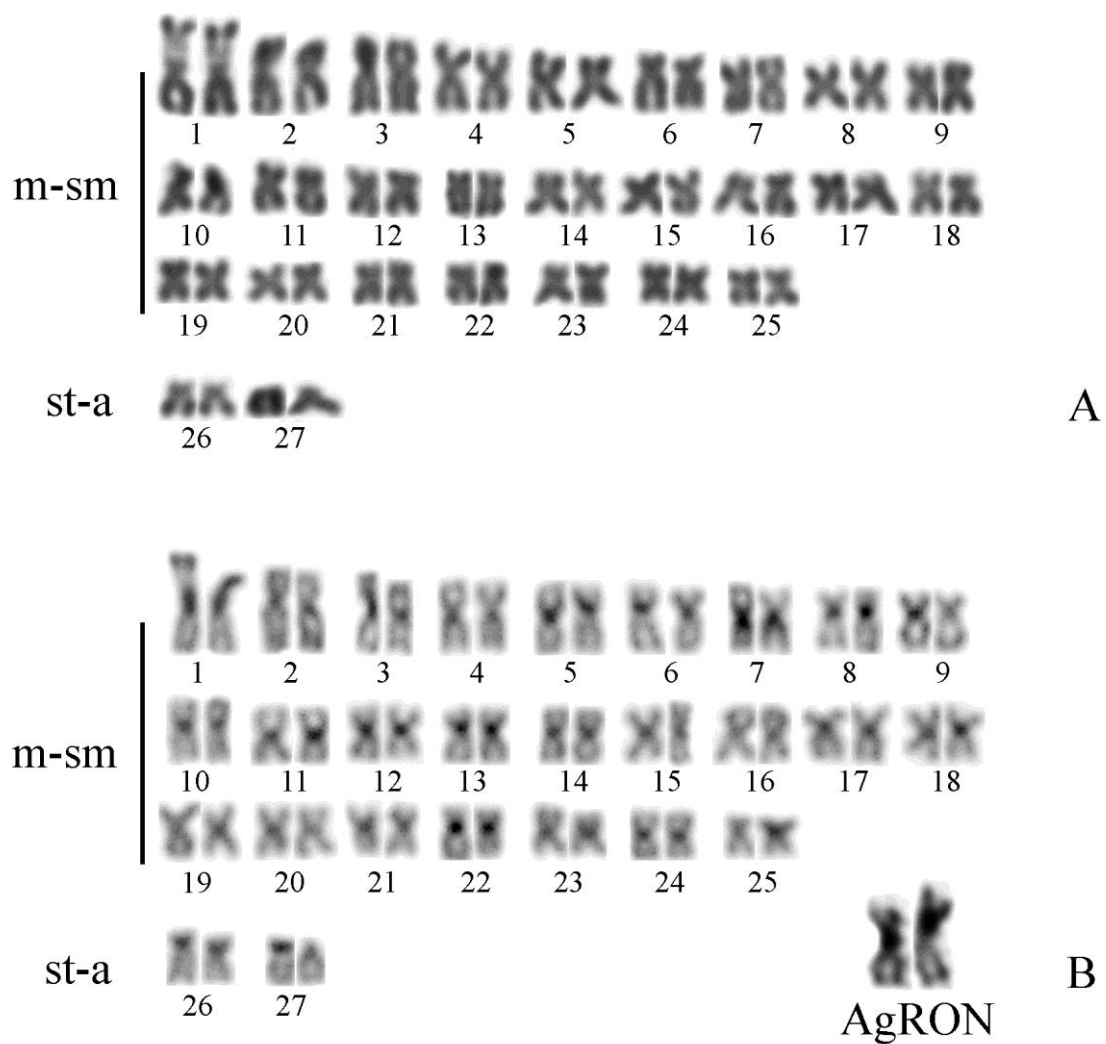


Fig. 2. Cariótipos obtidos após colorações em *Giemsa* (A), BC (B) e AgRON (destaque) de *G. cf. paraguensis*.

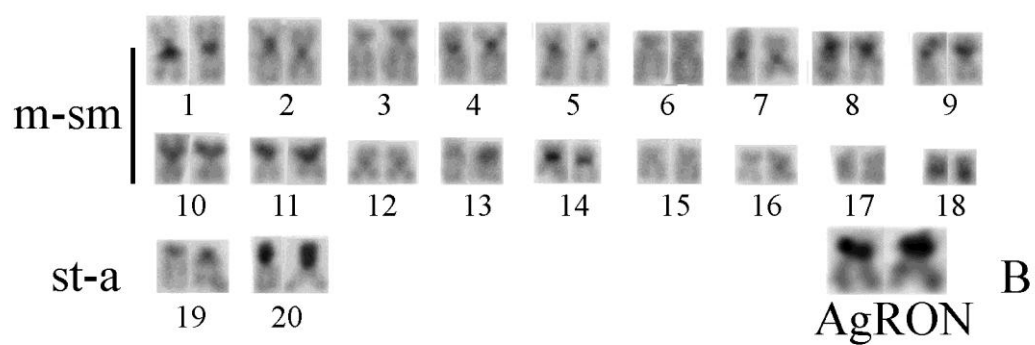
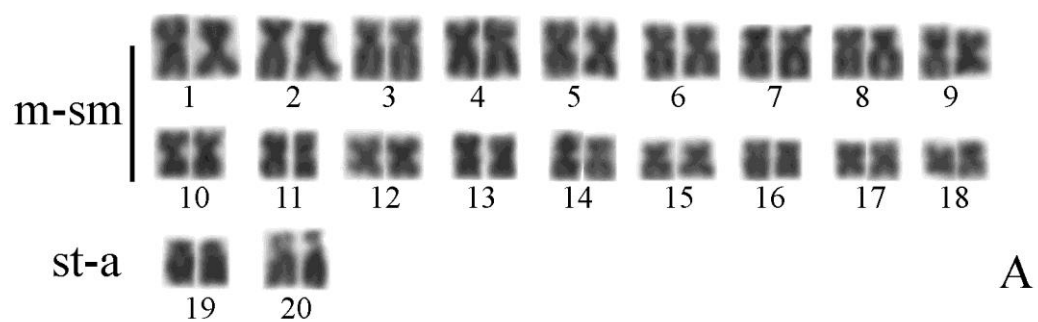


Fig. 3. Cariótipos obtidos após colorações em *Giemsa* (A), BC (B) e AgRON (destaque) de *G. sylvius*.

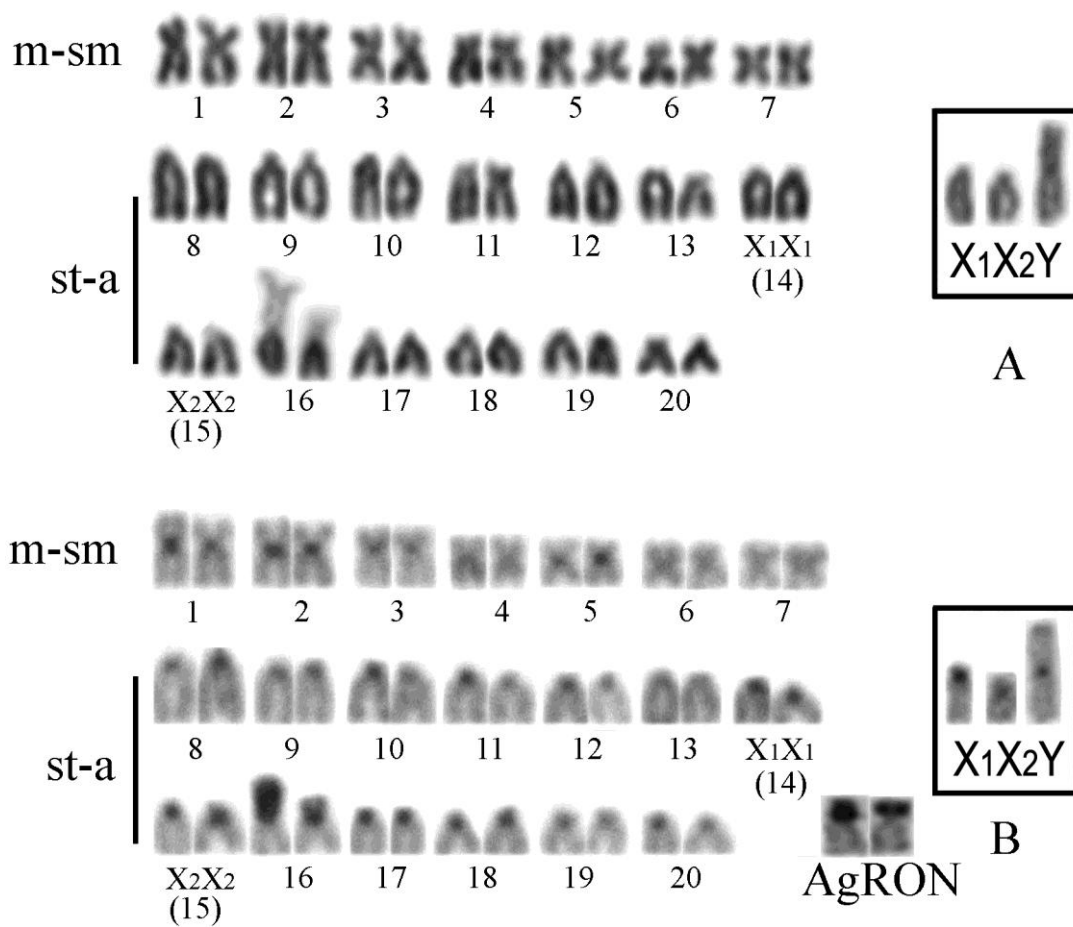


Fig. 4. Cariótipos obtidos após colorações em *Giemsa* (A), BC (B) e AgRON (destaque) de *G. pantanal*. Os cromossomos sexuais X_1X_2Y são mostrados *in box*.

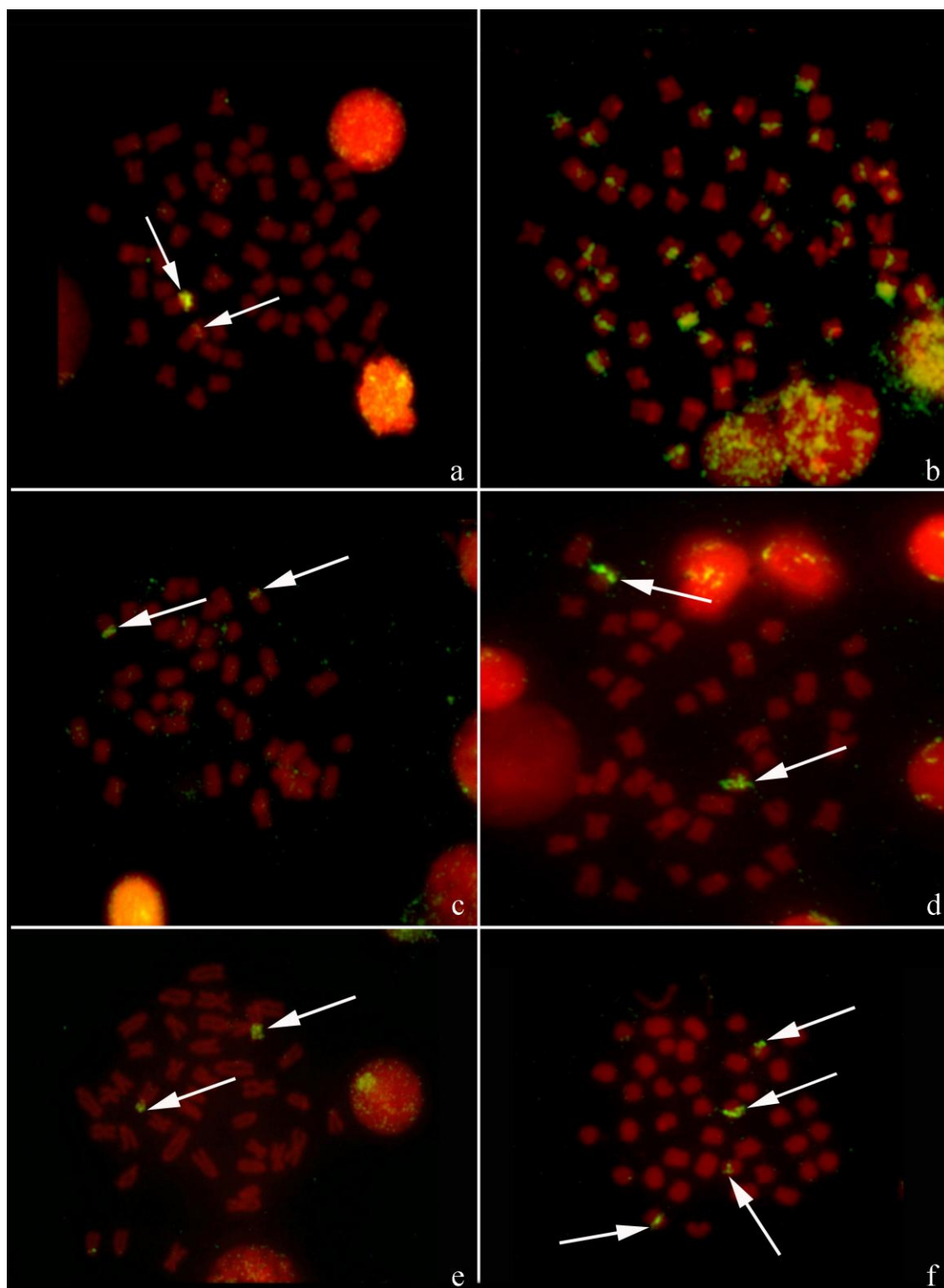


Fig. 5. Padrão de distribuição de sítios de DNAr 18S (a, c, e) e 5S (b, d, f) em metáfases de *G. cf. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal*, respectivamente.

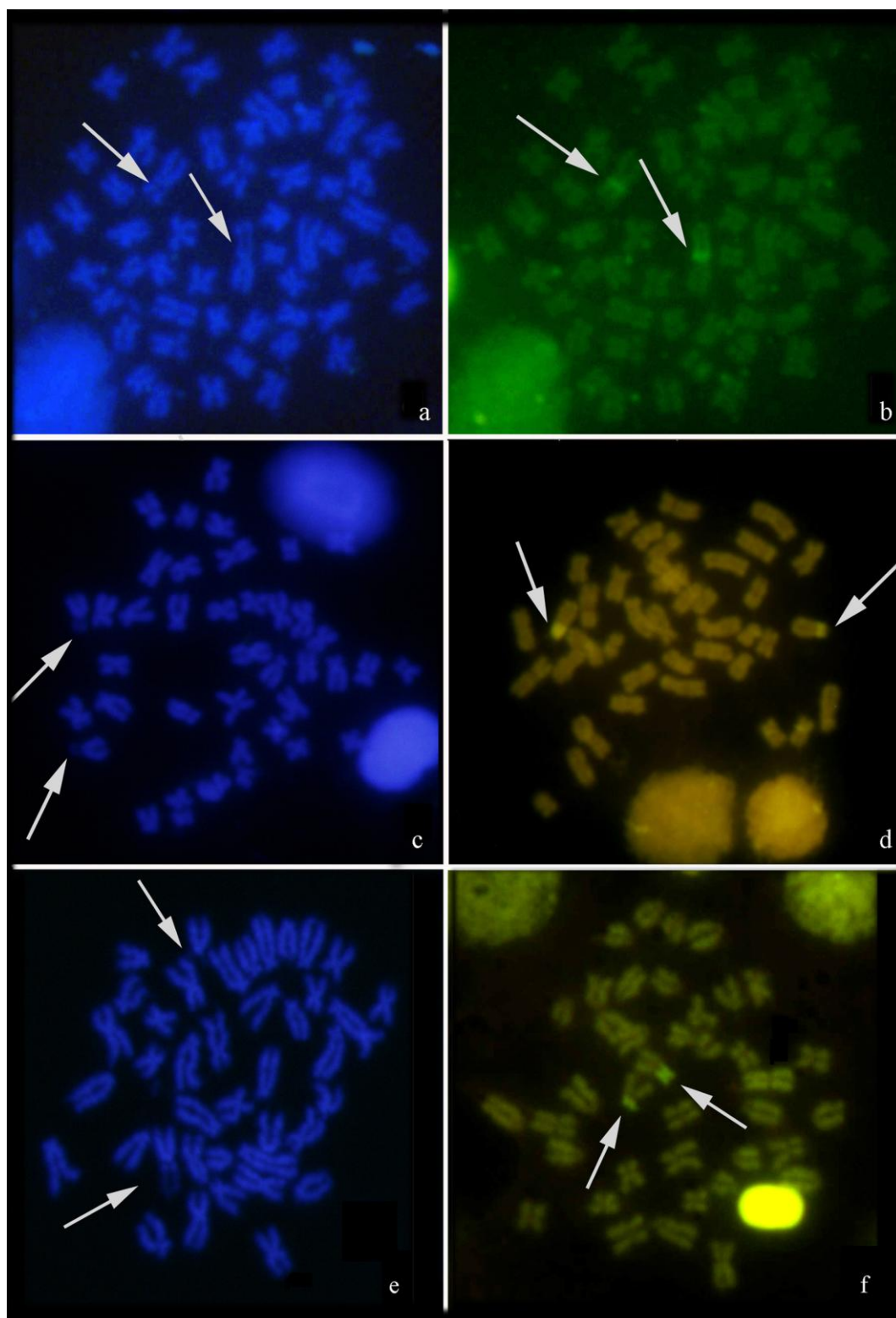


Fig. 6. Metáfases obtidas após coloração com DAPI e CMA₃ de *G. cf. paraguensis* (a,b), *G. sylvius* (c,d) e *G. pantanal* (e,f). As marcações AT⁻ e GC⁺ estão evidenciadas pelas setas, indicando o par da RON em todas as espécies.

Os dados moleculares de DNA *barcoding* se basearam na sequência parcial de 670 pb do gene mitocondrial COI de 27 espécimes, distribuídos em *G. sylvius* (n=2), *G. pantanal* (n=2) e *G. cf. paraguensis* (n=23) demonstrando três haplo grupos distintos, como visualizado no dendograma da Fig. 7. Para o cluster de *G. cf. paraguensis* foram observados ligeiras diferenças intraespecíficas com média de $1.15\% \pm 0.2$ e formação de 16 haplótipos. *G. sylvius* e *G. pantanal* formaram clusters bem definidos com haplótipos comuns dentro de cada cluster, apresentando respectivamente, variação intraespecífica de $0.6\% \pm 0.3$ e $0.1\% \pm 0.1$. A distância genética interespecífica foi alta, variando em média de 5-15% e esta representada na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da distância interespecífica K2P entre as espécies analisadas. *G. inaequilabiatus* (*) foi utilizada como grupo externo nas análises.

	<i>Gymnotus cf. paraguensis</i>	<i>Gymnotus pantanal</i>	<i>Gymnotus sylvius</i>
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	$15\% \pm 1.7$	$14\% \pm 1.6$	$15\% \pm 1.8$
<i>Gymnotus cf. paraguensis</i>	-	$6.9\% \pm 1.1$	$5.1\% \pm 0.9$
<i>Gymnotus pantanal</i>	-	-	$7.6\% \pm 1.2$

(*) dados gentilmente cedidos pelo Dr. Cláudio de Oliveira/UNESP/Botucatu.

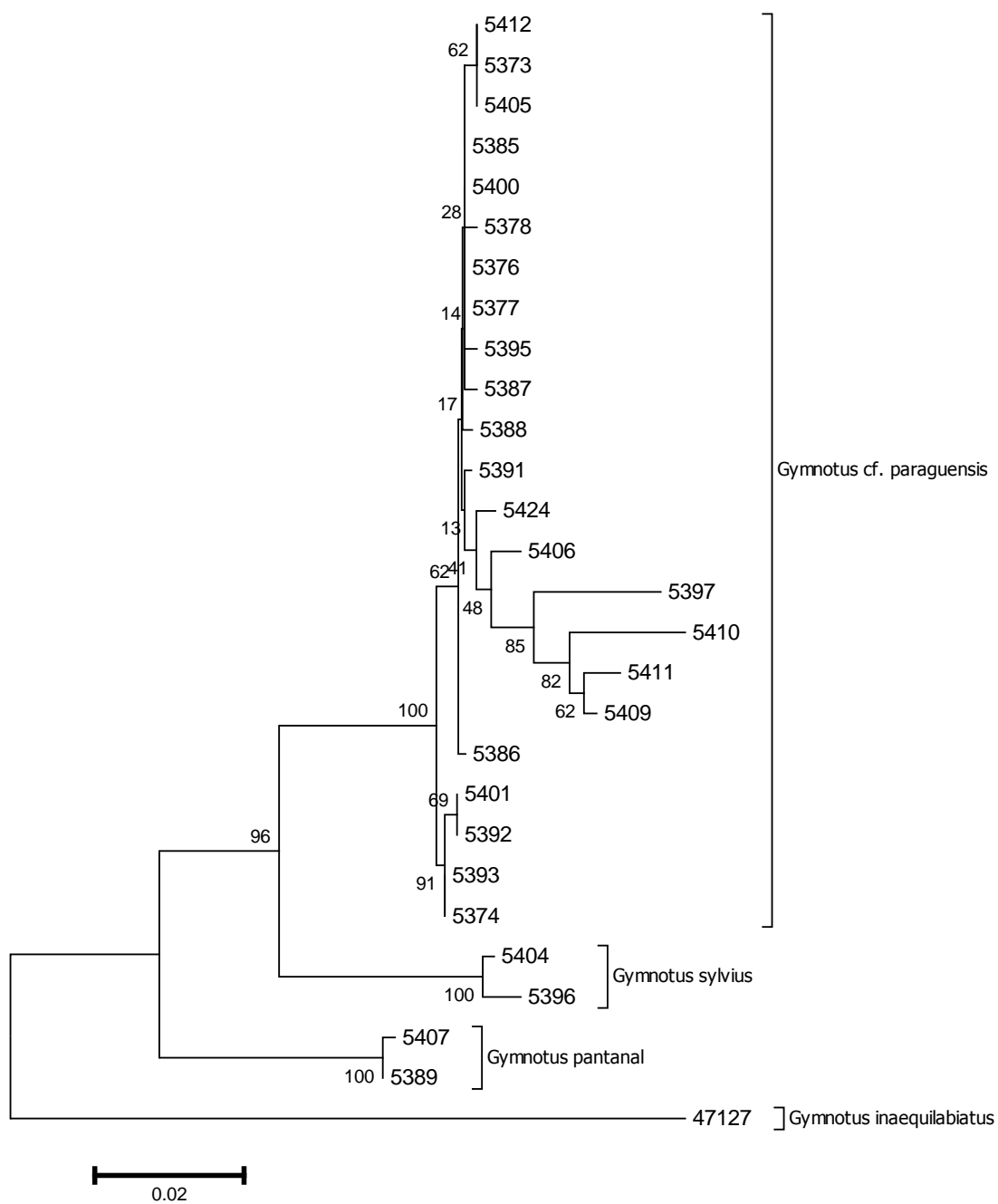


Fig. 7. Dendrograma obtido pela análise de *neighbour-joining* (NJ) baseada na distância K2P de 27 espécimes, agrupados em: *G. cf. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal* coletadas no médio Rio Paraguai.

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos citogenéticos

Em *Gymnotus*, o número diploide e as fórmulas cariotípicas são bastante variáveis (tabela 2). Os resultados do presente trabalho corroboram com esta variação como em *Gymnotus paraguensis* com $2n=54$ cromossomos (Margarido *et al.*, 2007), *Gymnotus inaequilabiatus* com $2n=52/54$ (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Scacchetti *et al.*, 2011), e as espécies anteriormente analisadas para outras bacias hidrográficas como *Gymnotus sylvius* com $2n=40$ cromossomos (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Scacchetti *et al.*, 2011) e *Gymnotus pantanal* com $2n=39/40$, portadora de sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Silva & Margarido, 2005; Margarido *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011). O padrão geral na identidade cromossômica nas populações de *Gymnotus* pode ser considerado uma importante ferramenta no diagnóstico taxonômico deste grupo tão diverso (Margarido *et al.*, 2007).

A alta diversidade de cariótipos observados em *Gymnotus* pode estar relacionada à baixa migração dos indivíduos, sendo os mesmos endêmicos de águas paradas (Scacchetti *et al.*, 2011; Albert *et al.*, 2005). Segundo Albert *et al.* (2005) e Albert & Crampton (2005) este grupo de peixes neotropicais apresenta comportamento migratório de curta distância, habitando diferentes ambientes que variam de sistemas de rios de fluxo a planícies de inundação. No período chuvoso, os indivíduos poderiam se dispersar passivamente favorecendo a manutenção do fluxo gênico entre as populações. No entanto, não foram evidenciadas diferenças cariotípicas nas populações estudadas, o que pode estar relacionado, segundo Milhomem *et al.* (2012a), à existência de barreiras de isolamento pós zigóticas.

A localização das regiões organizadoras de nucléolo pela impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS) e sondas de DNAr 18S revelou apenas um par de cromossomos homólogos, caracterizando um sistema de RONS simples para as três espécies estudadas. Resultados similares foram obtidos para o gênero *Gymnotus* (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2005; Margarido *et al.*, 2007; Scacchetti *et al.*, 2011; Milhomem *et al.*, 2012a). O polimorfismo interespecífico e intraespecífico de AgRONS já foi citado para diversos grupos de peixes, principalmente no que diz respeito ao tamanho e quantidade de

regiões ativas. De forma geral, para as espécies estudadas, as diferenças de tamanho observadas nesses sítios cromossômicos, não se mostram informativas no que se refere a caracterização das mesmas.

O sistema de AgRONS simples é o mais comum entre os Gymnotiformes, como em *Eigenmannia* sp., *E. virescens*, *Steatogenys elegans*, *Sternopygus macrurus*, *G. carapo*, *G. paraguensis*, *G. sylvius*, *G. cf. carapo*, *G. inaequilabiatus*, *G. pantherinus*, *G. mamiraua* e *G. arapaima* (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2004; Milhomem *et al.*, 2007; Milhomem *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2011; Scacchetti *et al.*, 2011; Milhomem *et al.*, 2012a,b; Milhomem *et al.*, 2013). O sistema de AgRONS simples pode ser considerado como ancestral em diferentes espécies quando comparadas às AgRONS múltiplas (Hsu *et al.*, 1975). No entanto, Milhomem *et al.* (2013) desconsidera estas condições de sistema simples ou múltiplos como caráter primitivo e/ou derivado, pois estas situações podem ter origem e composições divergentes entre as espécies.

Estudando três espécies simpátricas de *Gymnotus*, Lacerda & Maistro (2007) sugerem o uso das AgRONS como uma ferramenta citotaxonômica para este grupo de peixes. Entretanto, deve-se considerar que este método é uma forma indireta para localização das RONS, uma vez que o nitrato de prata se associa a proteínas nucleolares produzidas na interfase antecedente à fixação das células (Miller *et al.*, 1976; Nirchio & Oliveira, 2006). Neste caso, de forma similar ao que se realizou no presente trabalho, o sistema de RONS simples foi confirmado pelo mapeamento físico de sequências de DNAr 18S em cromossomos homólogos, independentemente de sua atividade.

Em relação aos segmentos do DNAr 5S, os dados obtidos para *G. sylvius* e *G. pantanal* estão de acordo com o obtido por Scacchetti *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2011), respectivamente. A evidencia de apenas um par de cromossomos para sítios de DNAr 5S em *G. sylvius* já era esperada, uma vez que o gene ribossômico 5S geralmente corresponde a uma região altamente conservada no genoma (Long & David, 1980). Mesmo apresentando quatro marcações para o DNAr 5S, *G. pantanal* também exibiu padrão conservado quanto a sua localização intersticial, padrão que pode ser encontrado em táxons eucariontes não relacionados (Martins & Galetti, 2001b). Segundo Martins & Galetti (2001b) e Galetti & Martins (2004), a distribuição intersticial dos genes RNAr

5S pode representar alguma vantagem quanto a organização desses genes no genoma dos vertebrados.

O padrão de distribuição das sequências de DNAr 5S em *G. cf. paraguayensis* pode estar relacionado a rearranjos estruturais no cariótipo desta espécie. Desse modo, Scacchetti *et al.* (2011) sugerem para *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* e *G. pantherinus* a dispersão facilitada desta sequência genética a partir de quebras em regiões heterocromáticas. Segundo Cioffi *et al.* (2010), elementos transponíveis de retrotransposons (Rex3) foram associados a dispersão e distribuição de DNAr 5S em *Erythrinus*. Entretanto, os estudos têm indicado que os elementos transponíveis são componentes estruturais importantes das regiões heterocromáticas. Esses sítios aparentemente têm desempenhado um papel importante na evolução do genoma de peixes (Cioffi & Bertollo, 2012). De acordo com Pansonato-Alves *et al.* (2011) a existência de pseudogenes não deve ser descartada para explicar essa alta variação observada em casos similares, uma vez que a heterocromatina pode apresentar sequências semelhantes às observadas no DNAr 5S, inativas, como proposto para *Centropyge aurantonotus* (Affonso & Galetti, 2005).

Os estudos realizados para a caracterização do padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva com hidróxido de bário revelou a ocorrência de blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas e pericentroméricas das espécies em estudo, assim como o observado em várias outras espécies de Gymnotiformes (Milhomem *et al.*, 2012a). Entretanto, de maneira geral, esse marcador não foi eficiente em demonstrar alguma característica que pudesse ser considerada espécie-específica, com segurança. Diante disso, a utilização dos fluorocromos DAPI e CMA₃, foi importante por possibilitar uma melhor caracterização dos diferentes blocos heterocromáticos visualizados nas três espécies.

Fluorocromos base-específicos realçam regiões cromossômicas ricas em pares de base, sejam elas ricas em AT quando coradas com DAPI ou ricas em pares de bases GC quando coradas com CMA₃. No presente trabalho, as bandas produzidas por CMA₃ (GC⁺) são coincidentes com os blocos heterocromáticos associados às AgRONS. Segundo Nascimento *et al.* (2006), a observação de regiões fluorescentes CMA₃⁺ preferencialmente nos sítios associados às AgRONS corrobora estudos de várias espécies de peixes neotropicais. Exemplos disso podem ser observados nas espécies *G.*

mamiraua e *G. cf. carapo* que apresentaram regiões GC⁺ correspondentes a localizações das AgRONS (Milhomem *et al.*, 2007). Além desses peixes, esse padrão parece ser comum para a maioria das espécies neotropicais que já tiveram seus cariótipos caracterizados por esse fluorocromo, como são os casos de *Astyanax* spp (Tenório *et al.*, 2013), de várias espécies de Cichlidae (Valente *et al.*, 2012), de *Hoplias malabaricus* (Vitorino *et al.*, 2011) entre outras.

A coloração com DAPI não evidenciou regiões AT⁺ para nenhuma das espécies estudadas. De acordo com Sczepanski (2008) algumas vezes são notadas apenas regiões AT⁻, as quais coincidem com as bandas GC⁺. De acordo com Nascimento *et al.* (2006), as regiões marcadas mais intensamente pelo DAPI apresentam um padrão semelhante aos de bandamento C em *Pterophyllum scalare*. Este padrão foi relatado para várias espécies de Gymnotiformes (Milhomem *et al.*, 2007, 2008; Silva *et al.*, 2008; Milhomem *et al.*, 2012a,b); no entanto, essas marcações não foram aqui observadas.

5.2 Aspectos moleculares

Estudos de DNA *barcoding* empregando sequencia parcial do gene *citocromo oxidase subunidade I* (COI) esta sendo frequentemente utilizado como método eficiente na identificação de espécies animais e também para estimar a riqueza de espécies. Este tipo de estudo vem sendo amplamente realizado entre os diferentes grupos de organismos, como por exemplo, na estimativa de riqueza da ictiofauna em bacias hidrográficas (Carvalho *et al.*, 2011a), na fiscalização do comércio pesqueiro (Carvalho *et al.*, 2011b), em estudos taxonômicos e delimitação de espécies crípticas (Clare *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011, 2013; Bellafronte *et al.*, 2013). Dados de DNA *barcoding* associados a ferramentas citogenéticas evidenciaram especiação críptica em *Hoplias malabaricus* (Marques *et al.*, 2013).

Devido à alta diversidade cariotípica e a presença de espécies “mal resolvidas” em *Gymnotus*, a delimitação precisa dessas unidades pelo DNA *barcoding* se fez necessária. Neste sentido, este estudo é pioneiro ao examinar estas espécies de peixes neotropicais na grande planície pantaneira.

De maneira eficaz essa metodologia permitiu a discriminação dos espécimes analisados em três unidades, sendo elas *G. cf. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal*. A

divergência média K2P intraespecífica foi de 0.65%, valor 16 vezes menor ao encontrado entre as espécies cogenéricas (10.6%). Ward *et al.* (2005) obtiveram valores médios de 0.39% e 9.93% em comparações intra e interespecíficas, respectivamente, em peixes marinhos, mostrando fortemente a eficácia desta metodologia na discriminação de espécies. Hubert *et al.* (2008) ao estudarem peixes de água doce no Canadá, encontraram valores médios de 0.2% (coespecíficas) e 8.37% (cogenéricas), discriminando 93% das espécies.

Recentemente, Lara *et al.* (2010), ao estudarem peixes de água doce de Cuba encontraram valores médios de 0.6% (dentro da mesma espécie) e 9.1% (dentro do mesmo gênero), discriminando 96% das espécies. Contudo, estudos realizados por Ward *et al.* (2009) encontraram valores médios de 0.3% (coespecífica) e 8.4% (congêneres), discriminando 97.5% das espécies. Esses valores estão próximos ao observado no presente estudo (0.65% e 10.6%), mostrando que tais valores podem ser um padrão para as espécies de peixes (Pereira *et al.*, 2011). Segundo Pereira *et al.* (2013), esses valores médios entorno de 10% de diversidade interespecífica se deve ao pequeno número de espécies analisadas dentro de alguns gêneros. Portanto, a análise de espécies melhor representadas, com uma média de 5 espécimes/espécies e amostragem de várias áreas geográficas, permitira maior alcance de toda a variação genética, elevando os valores médios intraespecíficos.

De maneira bastante segura, os dados de DNA *barcoding* associados aos estudos citogenéticos foi decisiva na caracterização de pelo menos três unidades evolutivas independentes no grupo de organismos estudados. Assim, ficou evidente que o número de espécies efetivamente utilizadas como iscas vivas pelos pescadores do Pantanal sul Mato-Grossense, parece estar sendo subestimada. A princípio, pode-se afirmar, com certeza, que as unidades aqui reconhecidas como *G. pantanal* e *G. sylvius*, representam espécies bem definidas. Por outro lado, a espécie aqui referenciada como *G. cf. paraguensis* revelou uma variabilidade maior, carecendo ainda de uma melhor análise, com ampliação do número de indivíduos a serem sequenciados e ampliação da área de estudo para que se tenha segurança da real posição taxonômica desses organismos.

Tabela 2. Resumo da diversidade cariotípica em *Gymnotus* baseado na literatura.

Espécie	2n	FC	Localidade	Referência
<i>G. carapo</i>	54	44m+8sm+2st/a	Alto Paraná, SP	1
<i>G. inaequilabiatus</i>	52	40m+10sm+2st/a	Alto Paraná, SP	1
<i>G. inaequilabiatus</i>	54	42m+10sm+2st/a	Alto Paraná, SP	2
<i>G. sylvius</i>	40	28m+10sm+2st/a	Alto Paraná, SP	1
<i>G. sylvius</i>	40	22m+12sm+6st	Alto Paraná, SP	2
<i>G. sylvius</i>	40	36m/sm+4st/a	Alto Paraná, PR	3
<i>G. sylvius</i>	40	36m/sm+4st/a	Córrego Fundo, MG	4
<i>G. pantherinus</i>	52	38m+8sm+6st/a	Alto Paraná, SP	1
<i>G. pantherinus</i>	52	32m+18sm+2st	Aguapeú, SP	2
<i>G. cf. carapo</i>	54	38m+12sm+4st/a	Rio Miranda, MS	2
<i>G. pantanal</i>	40	14m/sm+26st/a	Corumbá, MS	5
<i>G. pantanal</i>	39/ 40	15m/sm+24st/a; 14m/sm+26st/a	Rio Piquiri, PR	6
<i>G. pantanal</i>	39/ 40	15m/sm+24st/a; 14m/sm+26st/a	Alto Paraná, PR	3
<i>G. pantanal</i>	40	14m/sm+26st/a	Alto Paraná, PR	3
<i>G. paraguensis</i>	54	48m/sm+6st/a	Rio Piquiri, PR	6
<i>G. paraguensis</i>	54	52m/sm+2st/a	Alto Paraná, PR	3
<i>G. paraguensis</i>	54	50m/sm+4st/a	Córrego Fundo, MG	4
<i>G. cf. carapo</i>	42	30m/sm+12st/a	Ilha do Marajó, PA	7
<i>G. mamiraua</i>	54	50m/sm+4st	Ilha do Marajó, PA	7
<i>G. carapo</i>	42	30m/sm+12st/a	Benfica, PA	8
<i>G. carapo</i>	40	34m/sm+6st/a	Almeirim, PA	8
<i>G. arapaima</i>	44	24m/sm+20st/a	Reserva Mamirauá, AM	9
<i>G. mamiraua</i>	54	42m/sm+12st/a	Ilha do Marajó, PA	9
<i>G. jonasi</i>	52	12m/sm+40st/a	Reserva Mamirauá, AM	9
<i>G. capanema</i>	34	20m/sm+14st/a	Capanema, PA	10

1- Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; 2- Scacchetti *et al.*, 2011; 3- Margarido *et al.*, 2007; 4- Lacerda & Maistro, 2007; 5- Fernandes *et al.*, 2005; 6- Silva *et al.*, 2011; 7- Milhomem *et al.*, 2007; 8- Milhomem *et al.*, 2008; 9- Milhomem *et al.*, 2012a; 10- Milhomem *et al.*, 2012b.

Abreviações: m/sm= metacêntrico/submetacêntrico; st/a= subtlocêntrico/acrocêntrico; FC= fórmula cariotípica.

6. CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas citogenéticas é indispensável para a compreensão da diversificação de *Gymnotus* e um complemento valioso para estudos taxonômicos. As diferenças cromossômicas estruturais indicam três espécies bem definidas, sendo elas *G. pantanal*, *G. sylvius* e *G. cf. paraguensis*.

O presente estudo foi pioneiro ao avaliar a eficácia do DNA *barcoding* na identificação de espécies de *Gymnotus* comercializadas como iscas vivas no Pantanal sul Mato-Grossense e os resultados evidenciam sua eficácia em identificar grupos taxonômicos que necessitam de maior atenção, como é o caso de *G. cf. paraguensis*.

A definição de que pelo menos três unidades evolutivas independentes são utilizadas como iscas vivas é uma informação valiosa na definição de estratégias de conservação dos recursos pesqueiros, na gestão da pesca profissional e na regulação do comércio desses peixes pelos ribeirinhos da região estudada. Estes resultados evidenciam a necessidade de revisão da legislação vigente para a regulação da pesca de tuviras e são importantes para a elaboração de um novo plano de manejo para a sustentabilidade da pesca de iscas no Pantanal sul Mato-Grossense.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affonso, P. R. A. M. & P. M. Galetti Jr. 2005. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*, 123: 227-233.
- Agostinho, A. A. & H. F. Júlio Jr. 1999. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. Pp. 374-400. In: Lowe-McConnel, R. H. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo, Edusp.
- Albert, J. S. & W. G. R. Crampton. 2005. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). Pp. 360-403. In: Bullock T. H., C. D. Hopkins, A. N. Popper & R. R. Fay (Eds). *Electroreception*. New York, Springer.
- Albert, J. S., W. G. R. Crampton, D. H. Thorsen & N. R. Lovejoy. 2005. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, 2: 375–417.

- Aljanabi, S. M. & L. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- Artoni, R. F., M. R. Vicari, L. Antonio & C. Bertollo. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos , resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences*, 6: 43–60.
- Baroni, S. 2010. Estudos moleculares em *Gymnotus pantherinus* (Gymnotiformes, Gymnotidae): uma abordagem sistemática e filogeográfica. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 141p.
- Bellafronte, E., T. C. Mariguela, L. H. G. Pereira, C. Oliveira & O. Moreira-Filho. 2013. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*, 11: 497-506.
- Bertollo, L. A. C. 1978. Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae). Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 164p.
- Bertollo, L. A. C., O. Moreira-Filho & P. M. Galetti Jr. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28: 153-159.
- Britski, H. A., K. Z. S. Silimon & B. S. Lopes. 1999. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. 184p. Embrapa. Serviço de Produção de Informação, Brasília.
- Britski, H. A., K. Z. S. Silimon & B. S. Lopes. 2007. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. 227p. Embrapa. Serviço de Produção de Informação, Brasília.
- Campos-da-Paz, R. 2003. Family Gymnotidae. Pp. 483-486. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr (Eds). *Check List of the Freshwaters of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Cardoso, A. L., J. C. Pieczarka, E. Feldberg, S. S. R. Milhomem, T. Moreira-Almeida, D. S. Silva, P. C. Silva & C. Y. Nagamachi. 2011. Chromosomal characterization of two species of genus *Steatogenys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny. *Revist Fish Biology Fisheries*, 21: 613-621.

Carvalho, N. O. 1986. Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai. Pp. 43-49. In: 1º Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. Brasília, Departamento de Difusão de Tecnologia.

Carvalho, D. C., D. A. A. Oliveira, P. S. Pompeu, C. G. Leal, C. Oliveira & R. Hanner. 2011a. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22: 80-86.

Carvalho, D. C., D. A. P. Neto, B. S. A. F. Brasil & D. A. A. Oliveira. 2011b. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22: 97-105.

Casiraghi, M., M. Labra, E. Ferri, A. Galimberti & F. D. Mattia. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 4: 440-453.

Catella, A. C. 2004. A pesca no Pantanal Sul: situação atual e perspectivas. 45p. Embrapa Pantanal, Corumbá.

Catella, A. C. 2007. Uso plural dos recursos pesqueiros estratégia para sua conservação. In: 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de água doce. Dourados, Embrapa Pantanal.

Catella, A. C., F. L. Nascimento, A. S. Moraes, E. K. Resende, D. F. Calheiros, M. D. Oliveira & S. S. Palmeiras. 1997. Ictiofauna. Pp. 323-400. In: Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai. Brasília.

Catella, A. C., R. O. Mascarenhas, S. P. Albuquerque, F. F. Albuquerque & E. R. M. Theodoro. 2008. Sistemas de estatísticas pesqueiras no Pantanal, Brasil: aspectos técnicos e políticos. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 174-192.

Cioffi, M. B. & L. A. C. Bertollo. 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. Pp. 197-221. In: Garrido-Ramos, M. A. (Eds). *Repetitive DNA*. São Carlos, Karger.

Cioffi, M. B., C. Martins & L. A. C. Bertollo. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*.

- Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 271.
- Clare, E. L., B. K. Lim, M. D. Engstrom, J. L. Eger & P. D. N. Hebert. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, 7: 184-190.
- Clare, E. L., B. K. Lim, M. B. Fenton & P. D. N. Hebert. 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *Plos One*, 6: e22648.
- Crampton, W. G. R. & J. S. Albert. 2006. Evolution of Electric signal diversity in Gymnotiform fishes. Pp. 1-72. In: Crampton, W. G. R. & J. S. Albert. *Electric Signal Evolution in Gymnotiformes*. Florida Museum of Natural History, University of Florida.
- Crampton, W. G. R., A. Rodríguez-Casttáneo, N. R. Lovejoy & A. A. Caputi. 2013. Proximate and ultimate causes of signal diversity in the electric fish *Gymnotus*. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 2523–2541.
- Egozcue, J. 1971. *Técnicas em Citogenética*. Pp. 144. Barcelona, Editorial Espaxs.
- Fernandes-Matioli, F. M. C., L. F. Almeida-Toledo & S. A. Toledo-Filho. 1997. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytogenetics Cell Genetics*, 78: 236-239.
- Fernades-Matioli, F. M. C., M. C. N. Marchetto, L. F. Almeida-Toledo & S. A. Toledo-Filho. 1998. High intraspecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian basins. *Caryologia*, 51: 221–234.
- Fernandes, F. M. C., J. S. Albert, M. F. Z. Daniel-Silva, C. E. Lopes, W. G. R. Crampton & L. F. Almeida-Toledo. 2005. A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotifae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa*, 933:1–14.
- Froese, R. & D. Pauly. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication <http://www.fishbase.org>, acessado em 20/05/2014.
- Galetti, P. M. Jr & C. Martins. 2004. Pp. 61-88. In: Guerra, M. *FISH - conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak & C. M. Francis. Identification of birds through DNA barcodes. 2004. *Plos Biology*, 2: e312.
- Howell, W. & D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hsu, T. C., S. E. Spirito & M. L. Pardue. 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25-36.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April & L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One*, 3: e2490.
- Junk, W. J. & C. N. Cunha. 2005. Pantanal: a large South America wetland at a crossroads. *Ecological Engineering*, 24: 391-401.
- Kerr, K. C. R., M. Y. Stoeckle, C. J. Dove, L. A. Weigt, C. M. Francis & P. D. N. Hebert. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7: 535-543.
- Kerr, K. C. R., D. A. Lijtmaer, A. S. Barreira, P. D. N. Hebert & P. L. Tubaro. 2009. Probing Evolution Patterns in Neotropical Birds through DNA barcode. *Plos One*, 4: e4379.
- Lacerda, M. C. V. & E. L. Maistro. 2007. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. *Cytologia*, 72: 89-93.
- Lara, A., J. L. Ponde de Leon, R. Rodriguez, D. Casane, G. Cote, L. Bernatchez & E. Garcia-Machado. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Research*, 10: 421-430.

- Levan, B. A., K. E. Fredga & H. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 201-220.
- Lévêque, C., T. Oberdorff, D. Paugy, M. L. J. Stiassny E P. A. Tedesco. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hidrologia*, 595: 545-567.
- Long, E. O. & I. B. David. 1980. Repeated genes in Eukaryotes. *Ann Rev Biochem*, 49: 727-764.
- Lovejoy, N. R., K. Lester, W. G. R. Crampton, F. P. L. Marques, & J. S. Albert. 2010. Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 278-290.
- Lowe-McConnel, R. H. 1999. Estudos Ecológicos de comunidades de peixes Tropicais. São Paulo, Edusp.
- Mago-Leccia, F. 1994. Electric fishes of the continental waters of America. Caracas, Venezuela.
- Margarido, V. P., E. Bellafronte, O. Moreira-Filho. 2007. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 70: 155–164.
- Marques, D. K. S. & D. F. Calheiros. 2013. Diversidade de tuviras comercializadas como iscas vivas pelas comunidades do Porto da Manga e Codrasa, Corumbá, MS. 12p. Embrapa Pantanal, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Corumbá.
- Marques, D. F., F. A. Santos, S. S. Silva, I. Sampaio & L. R. R. Rodrigues. 2013. Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology*, 11: 459-466.
- Martins, C. & P. M. Galetti Jr. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Haraciformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, C & P. M. Galetti Jr. 2001a. Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.

- Martins, C. & P. M. Galetti. Jr. 2001b. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?. *Genetica*, 111: 439-446.
- Milhomem, S. S. R., J. C. Pieczarka, W. G. R. Crampton, A. C. P. Souza, J. R. C. Jr & C. Y. Nagamachi. 2007. Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. *Zootaxa*, 1397: 55–62.
- Milhomem, S. S. R., J. C. Pieczarka, W. G. R. Crampton, D. S. Silva, A. C. P. Souza, J. R. Carvalho Jr & C. Y. Nagamachi. 2008. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*, 9:75
- Milhomem, S. S. R., W. G. R. Crampton, J. C. Pieczarka, D. S. Silva, A. L. Cardoso, P. C. Silva, J. A. Oliveira & C. Y. Nagamachi. 2012a. Chromosomal and electric signal diversity in three sympatric electric knifefish species (*Gymnotus*, Gymnotidae) from the Central Amazon Floodplain. *Revist Fish Biology Fisheries*, 22: 485-497.
- Milhomem, S. S. R., W. G. R. Crampton, J. C. Pieczarka, G. H. Shetka, D. S. Silva & C. Y. Nagamachi. 2012b. *Gymnotus capanema*, a new species of electric knife fish (Gymnotiformes, Gymnotidae) from eastern Amazonia, with comments on an unusual karyotype. *Journal of Fish Biology*, 80: 802-815.
- Milhomem, S. S. R., P. C. Scacchetti, J. C. Pieczarka, M. A. Ferguson-Smith, J. C. Pansonato-Alves, P. C. M. O'Brien, F. Foresti & C. Y. Nagamachi. 2013. Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *Plos One*, 8: e55608.
- Miller, E. A., V. G. Dev, R. Tantravahi, O. J. Miller. 1976. Supression of human nucleolus organizer activity in mause human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research*, 101: 235-243.
- Nascimento, A. L., A. C. P. Souza, E. Feldberg, J. R. Carvalho Jr, R. M. S. Barros, J. C. Pieczarka & C. Y. Nagamachi. 2006. Cytogenetic analysis on *Pterophyllum scalare* (Perciformes, Cichlidae) fro Jari River, Pará state. *Caryologia*, 59: 138-143.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. 622p. Canadá, Copyright.

- Nirchio, M. & C. Oliveira. 2006. Citogenética de peces. 126 p. Porlamar, Gráficas Internacional.
- Pansonato-Alves, J. C., C. Oliveira & F. Foresti. 2011. Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. *Genetics and Molecular Biology*, 34: 208-213.
- Pereira, L. H. G., G. M. G. Maia, R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22: 71-79.
- Pereira, L. H. G., R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC Genetics*, 14:20.
- Pinkel, D., T. Straume & J. W. Gray. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy Sciences*, 83: 2934-2938.
- Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. 734p. Porto Alegre, Edipucrs.
- Rodríguez-Cattaneo, A., A. C. Pereira, P. A. Aguilera, W. G. R. Crampton & A. A. Caputi. 2008. Species-specific diversity of a fixed motor pattern: the electric organ discharge of *Gymnotus*. *PloS One*, 3: e2038.
- Sánchez, S., A. Laudicina & L. C. Jorge. 2004. A new report of multiple sex chromosome system in the Order Gymnotiformes (Pisces). *Cytologia*, 69: 155-160.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Santiago, E. 2014. Bacia do Paraguai. In: <http://www.infoescola.com/hidrografia/bacia-do-paraguai/>. Acessado em 13/02/2014
- Santos, C. S. 2012. Projeto de Lei nº 3814, de 2012, que "Altera dispositivo à Lei nº 11959, de 29 de junho de 2009, para controlar, na Bacia do Pantanal, as atividades de pesca profissional". Nota técnica. Embrapa Pantanal, Brasília.

- Santos, G. M., B. Mérona, A. A. Juras & M. Jégu. 2004. Gymnotiformes. Pp. 100-107. In: Santos, G. M., B. Mérona, A. A. Juras & M. Jégu. Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidroelétrica Tucuruí. Brasília, Eletronorte.
- Scacchetti, P. C., J. C. Pansonato-alves, R. Utsunomia, C. Oliveira & F. Foresti. 2011. Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. *Comparative Cytogenetics*, 5: 223-235.
- Scacchetti, P. C., J. C. P. Alves, R. Utsunomia, F. L. Claro, L. F. Almeida-Toledo, C. Oliveira & F. Foresti. 2012. Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 136: 131-137.
- Schweizer, D. 1976. Reserve fluorescent chromosome banding with Chromomycin and Dapi. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Sczepanski, T. S. 2008. Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (Teleostei, Siluriformes) pertencentes ao litoral paranaense. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 89p.
- Silva, E. B & V. P. Margarido. 2005. An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes*, 73: 293-297.
- Silva, D. S., S. S. R. Milhomem, A. C. P. Souza, J. C. Pieczarka & C. Y. Nagamachi. 2008. A conserved karyotype of *Sternopygus macrurus* (Sternopygidae, Gymnotiformes) in the Amazon region: differences from other hydrographic basins suggest cryptic speciation. *Micron*, 39: 1251-1254.
- Silva, D. S., S. S. R. Milhomen, J. C. Pieczarka & C. Y. Nagamachi. 2009. Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics*, 10:74.

- Silva, M., D. A. Matoso, M. R. Vicari, M. C. Almeida, V. P. Margarido & R. F. Artoni. 2011. Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134: 303-307.
- Suganuma, C. H. 2008. Avaliação da diversidade genética de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Tese (doutorado), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 130p.
- Summer, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tenório, R. C. C. O. 2012. Diversificação cariotípica no gênero *Astyanax* (Characidae) com enfoque na citotaxonomia do grupo. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 117p.
- Tenório, R. C. C. O., C. A. Vitorino, I. L. Souza, C. Oliveira & P. C. Venere. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group.
- Valente, G. T., C. A. Vitorino, D. C. Cabral-de-Melo, C. Oliveira, I. L. Souza, C. Martins & P. C. Venere. 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia River system, Brazil, by conventional cytogenetic methods. *Comparative Cytogenetics*, 6: 163-181.
- Vitorino, C. A., I. L. Souza, J. N. Rosa, G. T. Valente, C. Martins & P. C. Venere. 2011. Molecular cytogenetics and its contribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). *Journal of Fish Biology*, 78: 1239-1248.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1847-1857.

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

Welcomme, R. L. 1986. Proposal for studies of the Fisheries of the Pantanal. 6p. Disponível em: http://www.cpap.embrapa.br/pesca/online/PESCA1986_Welcomme1.pdf (acesso em 23/03/2014).

White, T. J., T. Burns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innes, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds). *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, CA.

8. ANEXOS

8.1. Preparação de cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram obtidas seguindo a técnica de preparação direta a partir do rim anterior descrita por Egozcue (1971) modificado por Bertollo et al. (1978). As divisões celulares no tecido renal foram aceleradas graças à aplicação de uma solução mitogênica (fermento biológico + glicose) em alguns exemplares. As análises cariotípicas foram inicialmente realizadas pela coloração convencional Giemsa, no qual foi tomado o número diploide de cada espécime. Posteriormente, os cromossomos foram classificados com base no índice de relação de braços (RB= comprimento do braço maior/comprimento do braço menor): metacêntricos (M) de 1.00-1.70mm, submetacêntrico (SM) de 1.71-3.00mm, subtelo-cêntrico (ST) de 3.01-7.00mm e acrocêntricos (A) >7.01mm, seguindo a classificação proposta por Levan *et al.* (1964).

A técnica direta de preparação mitótica de cromossomos consiste em várias etapas, sendo elas:

1. Injetar intraperitonealmente solução aquosa de colchicina a 0.025%, sendo 1ml à cada 100g de peso animal.
2. Deixar os exemplares em aquário bem aerado, repouso por 30 minutos, sacrificando-o em seguida. Retirar o rim encefálico.

3. Lavar o tecido renal em solução hipotônica de KCl a 0.075M, transferi-lo para cuba de vidro contendo 6ml dessa mesma solução.
4. O material deve ser totalmente dissolvido com pinças de dissecação para separação das células. Completar esse processo com movimentos de aspiração e expiração do material por intermédio de seringa hipodérmica, desprovida de agulha.
5. Manter a solução obtida à 37°C por 20 minutos.
6. O material deve ser ressuspensão com auxílio de pipeta Pauster, transferindo o conteúdo para um tubo de centrífuga, desprezando os fragmentos de tecidos não dissolvidos. Acrescentar 6 gotas de fixador (solução composta por álcool metílico e ácido acético na proporção 3:1) recém preparado, suspender novamente o material.
7. Centrifugar por período de 10 minutos, a 900 rpm, descartando o sobrenadante.
8. Adicionar 6 ml de fixador (3:1), deixando-o escorrer através das paredes do tubo.
9. Ressuspender o material com o auxílio de pipeta Pauster, centrifugar por 10 minutos à 900 rpm.
10. Repetir as etapas 8 e 9 por mais duas vezes. Ao final da última centrifugação, eliminar o sobrenadante e adicionar 1 a 2 ml de fixador (3:1). O volume de fixador dependerá da quantidade do material.
11. Pingar 2 ou 3 gotas de suspensão refrigerada, com auxílio de pipeta Pauster, sobre uma lâmina limpa previamente aquecida em banho-maria à 60°C.
12. Deixar a lâmina secar em temperatura ambiente até secar completamente.
13. Corar com Giemsa à 5% por 10 minutos e lavar em água corrente. Deixar secar completamente.
14. Manter o material em tubos 1.5 ml devidamente identificados e refrigerados à -20C.

8.2. Detecção das regiões organizadoras de Nucléolo (NORs e/ou RONS) – técnica de impregnação pelo nitrato de prata (AgRONS):

A técnica foi descrita por Howell & Black (1980), consistindo em:

1. Sobre uma lâmina previamente pingada, adicionar uma gota de gelatina em cada extremidade da lâmina.

2. Adicionar duas gotas de água destilada sobre cada gota de gelatina.
3. Em cada extremidade, pingar duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata. Cobrir com lamínula.
4. Levar à 60°C até adquirir coloração dourada.
5. Após alcançar a coloração desejada, lavar bem em água corrente, até a retirada da lamínula.
6. Corar com Giemsa 2% por 30 segundos.
7. Lavar em água corrente e deixar secar completamente.

8.3. Detecção de Heterocromatina Constitutiva (BC)

A técnica para a detecção da heterocromatina constitutiva seguiu Sumner (1972):

1. Pingar as lâminas no dia.
2. Tratar a lâmina com HCl (0.2M) à 30°C por 10 minutos.
3. Lavar em água destilada. Deixar as lâminas em solução de bário 5% à 42°C por 1 minuto. Ressuspender as lâminas a cada 10 segundos.
4. Imergir as lâminas rapidamente em solução de água e HCl (1:1).
5. Enxaguar com água destilada.
6. Incubar as lâminas em solução salina 2xSSC à 60°C por 30 minutos.
7. Enxaguar em água destilada. Deixar secar em temperatura ambiente.
8. Corar com 30µl de iodeto de propídeo, manter sob refrigeração em câmara escura.

8.4. Fluorocromos base-específico GC/AT – técnica de coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI

1. Colocar as lâminas já preparadas segundo a técnica para cromossomos mitóticos, em cubetas, imersas numa solução tampão McIlvaine + MgCl₂ à temperatura ambiente por 10 minutos.
2. Retirar as lâminas e agitá-las brevemente, removendo o excesso do tampão secando a face oposta a do material com papel absorvente. Adicionar 50µl de DAPI (1mg/ml) ou

CMA₃ (0.5mg/ml – dissolver 5mg de cromomicina em 10ml de tampão McIlvaine diluído 1:1 em água destilada). Cobrir o conjunto de lâminas e deixar corando em câmara escura por 30 minutos em temperatura ambiente.

3. Remover as lamínulas em tampão McIlvaine (pH 7.0), lavando as lâminas vagorosamente nesta solução. Deixar as lâminas no tampão enquanto se prepara a solução Methyl-Green/Hepes (0.006g de Methyl-green + 50ml Hepes/NaCl ou 0.012g de Methyl-green + 100ml Hepes/NaCl).

4. Incubar as lâminas em solução de Methyl-green/Hepes (recém preparadas) por 15 minutos.

5. Lavar as lâminas em solução de Hepes/NaCl.

6. Secar as lâminas com papel toalha, pingar uma gota da solução de glicerol propilgalato e montar as lâminas permanentes com lamínulas.

7. Deixar as lâminas sob refrigeração, em câmara escura por no mínimo uma semana para estabilização do fluorocromo. Analisar em microscopia de epifluorescência.

8.5. FISH DNAr 5S e 18S – *Fluorescent in situ Hybridization*

As regiões específicas de sítios de DNAr 5S e 18S foram detectadas seguindo protocolo de Pinkel *et al.* (1986) modificado posteriormente por Martins & Galetti (2001).

8.5.1. Marcação da sonda

A sonda deveser marcada pelo método *Nick translation*, utilizando o kit BioNick Labelig System™ (Invitrogen), correspondendo as seguintes etapas:

a) Preparar Mix contendo:

1µl 10x dNTP mix;

1µl DNA sonda (200ng/µl);

1µl mix de enzima;

6µl de água MiliQ;

b) misturar bem, centrifugar brevemente (para a enzima agir) e incubar a 16°C por 40 minutos para DNAr 5S ou 1 hora e 20 minutos para DNAr 18S;

- c) Adicionar 1µl de stop buffer, 1µl de acetato de sódio 3M e 22µl de etanol 100% gelado.
- d) Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e levar ao -20°C por 3 horas ou no -70°C por 1 hora.
- e) Centrifugar por 15 minutos a 15000 rpm a 4°C.
- f) Descartar o sobrenadante e deixar secar.
- g) ressuspender em 6µl de água MiliQ.

8.5.2. Preparação de lâminas

As lâminas devem ser preparadas com 24 horas de antecedência:

- a) Desidratar em serie etanólica 70%, 80% e 100% gelados, por 5 minutos em cada, logo após secar em temperatura ambiente.
- b) Desnaturar o DNA cromossômico em formamida 70% em 2x SSC a 60°C por 2 minutos.
- c) Desidratar as lâminas em série de etanol 70%, 80% e 100% por 2 minutos cada.

8.5.3. Mix de hibridação

Em tudo de 1.5ml contendo de 6µl de sonda, 15µl de formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final de 10%) e 6µl de solução salina 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Misturar bastante o mix de hibridação depois de pronto. Centrifugar, desnaturar a 100°C por 10 minutos no termociclador e passar imediatamente ao gelo até o uso (choque térmico).

8.5.4. Hibridação

Colocar 30µl de solução de hibridação em lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo. Incubar as lâminas em câmara úmida a 37°C *overnight*. A câmara úmida deve ser preparada com toalha de papel molhadas com solução salina 2xSSC.

8.5.5. 1xPBD (para 360ml)

- a) 72ml de 20xSSC;

- b) 1.8ml de Triton 100 ou 180µl de Tween puro;
- c) 3.6g de leite em pó desnatado;
- d) 286.2ml de água destilada q.s.p. 360ml;

8.5.6. Lavagens pós-hibridação

- a) Lavar as lâminas em 0.1xSSC a 42°C por 5 minutos, sem agitação;
- b) Lavar as lâminas duas vezes em 2xSSC em temperatura ambiente por 5 minutos, com agitação.

8.5.7. Detecção e amplificação do sinal

- a) Sobre uma lamínula colocar 30µl de FITC-Avidina (26µl de tampão C ou 1xPBD + 4µl de avidina-FITC 1:100). Inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 30 minutos em câmara úmida com 2xSSC a 37°C.
- b) Remover a lamínula e lavar três vezes em 1xPBD a 45°C por 4 minutos com agitação.
- c) Incubar com 20µl de anti-avidina-biotina conjugada (1µl anti-avidina + 19µl 1xPBD) por lâmina durante 10 minutos em câmara escura a 37°C.
- d) Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1xPBD a 45°C por 4 minutos com agitação.
- e) Sobre uma lamínula 30µl de FITC-Avidina (26µl de tampão C + 4µl de avidina-FITC 1:100). Inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 10 minutos em câmara úmida com 2xSSC a 37°C.
- f) Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1xPBD a 45°C por 4 minutos com agitação.
- g) Secar levemente a lâmina e montar com o corante de preferência: 20µl de meio de montagem *antifading* com 0.7µl de solução de iodeto de propídio a 50µg/ml.

8.6. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de suspensão celular refrigerado -20 °C seguindo o protocolo de Aljanabi & Martinez (1997) e consiste em:

- a) A suspensão celular obtida na preparação de cromossomos mitóticos foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 10000rpm. Ao final da centrifugação, o fixador foi descartado e o material levado a 37°C até secar completamente.
- b) Adicionar 440µl de tampão de digestão (8ml de NaCl 5M, 1ml de Tris HCl 1M pH8.0, 400µl de EDTA 0.5M pH8.0, 20ml de SDS 10% e 70.6ml de água MiliQ para completar o volume final de 100ml) e 5µl de proteinase K (10mg/µl), passar no vórtex.
- c) Levar ao banho-maria a 55°C de 1-3 horas, até o material for todo digerido e apresentar aparência viscosa.
- d) Adicionar 300µl de NaCl 5M, inverter os tubos e levar ao vórtex por 30 segundos.
- e) Centrifugar a 10000rpm durante 10 minutos.
- f) Remover o sobrenadante para outro tubo (cerca de 500µl) e adicionar 500µl de isopropanol 100% gelado, inverter os tubos para a precipitação do DNA.
- g) Centrifugar por 10 minutos a 10000rpm.
- h) Descartar o isopropanol e adicionar 300µl de etanol 70%.
- i) Centrifugar por 10 minutos a 10000rpm e descartar o etanol, lavar novamente 2 vezes em etanol 70% nas mesmas condições de centrifugação. O etanol 70% remove resíduos de sais. Secar por 30 minutos à 37°C ou deixar *overnight*.
- j) Ressuspender o DNA em 50µl de água MiliQ autoclavada.
- k) Tratar com 5µl de RNase em banho-maria por 30 minutos à 37°C.
- m) Correr amostras em gel de agarose 0.5% para verificar a integridade do DNA e presença de RNA.
- n) Caso não seja visualizado a presença de RNA, seguir para a quantificação de DNA em bioespectrofotômetro.