

**LUCAS CAETANO DE BARROS**

DIFERENCIAÇÃO VICARIANTE RECENTE DE *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864 e  
*Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 NAS BACIAS DOS RIOS DOCE E SÃO  
FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B277d  
2012

Barros, Lucas Caetano de, 1985-

Diferenciação vicariante recente de *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864 e *Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 nas Bacias dos Rios Doce e São Francisco, Minas Gerais, Brasil / Lucas Caetano de Barros. – Viçosa, MG, 2012.  
xvi, 56f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jorge Abdala Dergan dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 17-23

1. *Characidae*. 2. *Incertae sedis*. 3. Cromossomos.  
4. Evolução (Biologia). 5. Vertebrado. 6. Peixe.  
7. Citogenética. 8. Morfometria. 9. Biologia molecular.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

**LUCAS CAETANO DE BARROS**

DIFERENCIAÇÃO VICARIANTE RECENTE DE *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864 e  
*Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 NAS BACIAS DOS RIOS DOCE E SÃO  
FRANCISCO, MINAS GERAIS, BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de abril de 2012

---

Gisele Mendes Lessa

---

Karine Frehner Kavalco

---

Rubens Pazza  
(Coorientador)

---

Renato Neves Feio  
(Coorientador)

---

Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Orientador)

*“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças”*

**Dedico esta dissertação**

Aos meus queridos pais Almerindo Xavier e Maria do Perpétuo pelo amor, confiança e por nunca terem desistido de mim.

## AGRADECIMENTOS

Como é gratificante encerrar mais uma etapa em nossa vida, mais uma parte do caminho trilhado e mais uma vez a certeza de que, sem a ajuda de tantas pessoas, nada seria possível.

Fundamentalmente, obrigado aos meus queridos pais, Almerindo Xavier e Maria do Perpétuo. Encerro esta etapa de minha vida acadêmica graças à perseverança, cuidado e dedicação de vocês, pelas renúncias aos seus sonhos para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.

A Denise Eliziana pelas revisões gramaticais, paciência, companheirismo e dedicação. Obrigado por transformar meus dias melhores.

A Gisele Oliveira pela hospitalidade quando cheguei a Viçosa, e principalmente, por te me apresentado ao Professor Jorge Dergam, sem a sua ajuda, eu não teria conhecido El Capitan.

Ao grande professor e orientador Jorge Dergam “capitão do Beagle”. Obrigado Jorge, por ser acima de tudo um grande amigo. Agradeço a confiança e as oportunidades dadas. Sou muito feliz por tê-lo conhecido e por ter você como alguém em quem me espelhar. Levarei seus ensinamentos e conselhos por toda a vida, obrigado por me ensinar a sorrir.

Ao meu grande amigo Udson (caboca) pela ajuda na criação desta dissertação, por todo ensinamento e paciência, esteja certo que, sem você as coisas seriam bem mais difíceis. Obrigado!

Aos marujos do Beagle meus sinceros agradecimentos, trabalhar com vocês durante estes anos foi e continuará sendo um privilégio, que nossas trocas constantes de conhecimento nunca terminem, e que possamos sempre almejar a excelência.

Os amigos de república Sebastião Rodrigues (Tião), Hilton Aguiar (Tio Hilton), Leonardo Pussente (Leo), nosso grande amigo Fabiano Ferreira (Saruno) obrigado pela família

“Cafófo do Osama”, ter vocês como amigos, com certeza, fez com que a saudade que sentíamos de nossas famílias diminuísse com nossas longas conservas na sala, já sinto saudades...

Aos amigos da academia “Vida Ativa” vocês foram minha válvula de escape, muito obrigado pelos momentos de pura diversão.

Ao REUNI e a CAPES, obrigado pela concessão da bolsa de mestrado durante o último ano.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFV agradeço a oportunidade de cursar o mestrado.

Enfim agradeço todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado e concluído. Meu Muito Obrigado!!!

## BIOGRAFIA

Lucas Caetano de Barros, filho de Almerindo Xavier de Barros e Maria do Perpétuo Socorro Caetano de Barros, nasceu dia 04 de fevereiro de 1985, natural de Dionísio, Minas Gerais.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2003, na Escola Estadual Dona Jacy Francisca Garcia, Dionísio, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2004 iniciou o curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, Coronel Fabriciano, Minas Gerais. Em 22 de junho de 2008 graduou-se Licenciado em Ciências Biológicas.

Em fevereiro de 2010 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrado seus estudos em morfometria, citogenética e biologia molecular em populações de *Oligosarcus*, defendendo a dissertação em abril de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	3
2.2.1. TESTAR HIPÓTESES.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	4
3.1. ÁREA DE ESTUDO.....	4
3.2. ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	4
3.3. ANÁLISES CITOGENÉTICAS.....	4
3.4. ANÁLISES MOLECULARES.....	5
4. RESULTADOS .....	6
4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	6
4.2. ANÁLISE CARIOTÍPICA.....	7
4.3. ANÁLISE MOLECULAR.....	9
5. DISCUSSÃO.....	10
5.1. PADRÕES DE VARIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	10
5.2. VARIABILIDADE CITOGENÉTICA.....	11
5.3. VARIABILIDADE MOLECULAR.....	15
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Locais de coleta nas bacias hidrográficas do rio Doce e São Francisco no Sudeste do Brasil.....	25
FIGURA 2- Análise de Componentes Principais (PCA) com todos os dezoito caracteres.....	26
FIGURA 3- Análise de Componentes Principais (PCA) com quatro caracteres diagnósticos Menezes(1987).....	27
FIGURA 4- Cariótipos das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> pertencentes às lagoas do médio rio Doce.....	28
FIGURA 5- Cariótipos das populações de <i>Oligosarcus argenteus</i> das bacias do alto rio Doce e São Francisco.....	29
FIGURA 6- Ag-NORs das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> pertencentes às lagoas do médio rio Doce.....	30
FIGURA 7- Ag-NORs das populações de <i>Oligosarcus argenteus</i> das bacias do alto rio Doce e São Francisco.....	31
FIGURA 8- Técnica de bandeamento C das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> e <i>Oligosarcus argenteus</i> .....	32
FIGURA 9- Técnicas de DAPI, CMA <sub>3</sub> e bandamento C/DAPI das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> médio rio Doce.....	33
FIGURA 10- Técnicas de DAPI, CMA <sub>3</sub> das populações de <i>Oligosarcus argenteus</i> das bacias do alto rio Doce e São Francisco.....	34

FIGURA 11- Hibridização de fluorescência <i>in situ</i> (FISH) das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> e <i>Oligosarcus argenteus</i> .....	35
FIGURA 12- Hibridização <i>in situ</i> para a sonda de microssatélites (CA) <sub>15</sub> das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> e <i>Oligosarcus argenteus</i> .....	36
FIGURA 13 - Rede de aplótipos construída através dos pares de bases do fragmento citocromo b para as populações de <i>Oligosarcus</i> das bacias do Rio Doce e São Francisco.....	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA II- Locais de coleta, número de espécimes utilizados para morfometria, citogenética, molecular, fórmula cromossômica e coordenadas geográficas.....	39
TABELA II- Caracteres considerados diagnósticos das espécies <i>Oligosarcus solitarius</i> e <i>Oligosarcus argenteus</i> Menezes, (1987).....	40
TABELA III- Dados moleculares de populações de <i>Oligosarcus</i> nas bacias dos rios Doce e São Francisco.....	41
TABELA IV- Estimativa média do fluxo gênico entre as populações de <i>Oligosarcus</i> das bacias do Rio Doce e São Francisco.....	42
TABELA V- Dados cariotípicos das espécies de <i>Oligosarcus</i> .....	43

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO I- Localização geográfica dos pontos de coleta nas lagoas do médio rio Doce.....	45
ANEXO II- Localização geográfica da lagoa Linguíça.....	46
ANEXO III- Exemplos de <i>Oligosarcis solitarius</i> pertencentes às lagoas do médio rio Doce.....	47
ANEXO IV- Exemplos de <i>Oligosarcus argenteus</i> das bacias do alto rio Doce e São Francisco.....	48
ANEXO V- Visibilidade dos dentes caniniformes em relação à mandíbula e maxila superior.....	49
ANEXO VI- Hibridização de fluorescência <i>in situ</i> (FISH) e sonda de microssatélites (CA) <sub>15</sub> das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> e <i>Oligosarcus argenteus</i> .....	50
ANEXO VII- Cariótipos das populações de <i>Oligosarcus solitarius</i> pertencentes às lagoas do médio rio Doce.....	51
ANEXO VIII- Cariótipos das populações de <i>Oligosarcus argenteus</i> pertencentes às bacias do alto rio Doce e São Francisco.....	52

## RESUMO

BARROS, Lucas Caetano, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Diferenciação vicariante recente de *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864 e *Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 nas bacias dos rios Doce e São Francisco, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientadores: Renato Neves Feio e Rubens Pazza.

A bacia do rio Doce é uma drenagem costeira e está isolada da bacia do São Francisco pela Serra do Espinhaço. Das 77 espécies nativas conhecidas para a bacia, 37 são consideradas ameaçadas de extinção, sendo *Oligosarcus solitarius* Menezes 1978 a única espécie endêmica neste sistema de lagoas quaternárias. Sua espécie-irmã, *O. argenteus* Günther, 1864, ocorre na mesma bacia, mas é restrita à calha e às cabeceiras de tributários. O presente trabalho visa a determinação do status específico das populações de *Oligosarcus*, a partir da análise de 21 populações da bacia do rio Doce e uma população de *Oligosarcus* da cabeceira do rio Das Velhas, na bacia do rio São Francisco. A abordagem incluiu o uso de técnicas morfológicas, citogenéticas e moleculares. A análise de componente principal (PCA) indicou a existência de três grupos de populações: a restrita à cabeceira do rio Das Velhas, a que ocorre na calha e cabeceiras do rio Doce e as populações das lagoas quaternárias. Os dados citogenéticos (coloração convencional, Ag-NOR, bandamento C, fluorocromos e FISH e marcador de microssatélite) corroboraram parcialmente a hipótese da existência de dois grandes grupos que correspondem geograficamente aos locais de ocorrência de *O. solitarius* e *O. argenteus* na bacia do rio Doce, mas indicaram também altos níveis de diferenciação cromossômica dentro de cada grupo. Os padrões de variação cromossômica assemelharam-se aos indicados para outras espécies do mesmo gênero. Os dados moleculares confirmaram que a especiação das duas espécies foi recente. Considerados em conjunto, os dados confirmam a ocorrência de populações diferenciadas e estreitamente aparentadas no sistema de lagoas quaternárias e a existência de mais duas espécies na cabeceira do rio Das Velhas e do rio Doce e sugerem a necessidade de reavaliação do material tipo coletado por Günther em 1861. Considerando que o alto grau de variação cromossômica de *O. solitarius* ocorreu nos últimos 14.000 - 3.365 anos, conclui-se que estas espécies-irmãs apresentam a mais alta taxa de evolução cromossômica dos peixes neotropicais.

## ABSTRACT

BARROS, Lucas Caetano, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Recent vicariant differentiation in *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864 and *Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 in the Rio Doce and São Francisco basins, Minas Gerais State, Brazil.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-advisers: Renato Neves Feio and Rubens Pazza.

The Rio Doce Basin is a coastal drainage isolated from the São Francisco Basin by the Serra do Espinhaço Mountains. Of this basin's 77 known native species, 37 are considered endangered with one of them, *Oligosarcus solitarius* Menezes 1978, being the only species endemic to the Quaternary lakes. Its sister species, *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864, occurs in the same basin but is restricted to the main channel and tributaries headwaters. The present work aims to determine the specific status of *Oligosarcus* in the Doce River Basin and included 21 populations from the Doce River Basin and one from the upper Das Velhas River in the São Francisco Basin. This study used morphological, cytogenetic and molecular techniques. Principal Component Analysis (PCA) indicated three groups of populations: one restricted to the headwaters of the Das Velhas River, a second that occurs in the main channel of the headwaters of the Doce River, and a third occurring in the Quaternary lakes. Cytogenetic data (conventional stain, Ag-NOR and C-banding, fluorochromes, FISH, and microsatellite markings) partially corroborated the hypothesis of two groups geographically corresponding to the locals of occurrence of *O. solitarius* and *O. argenteus* in the Rio Doce Basin, but also indicated high levels of chromosomal differentiation within each group. The chromosomal variation was similar to that observed in other species of this genus. Molecular data confirmed that the speciation of the two species was recent. Considered together, the data confirmed the occurrence of differentiated but closely related populations in the Quaternary lake system and the existence of two more species in the headwaters of the Das Velhas and Doce Rivers, suggesting the need to re-evaluate the material type collected by Günther in 1861. Considering that the highest degree of chromosomal variation in *O. solitarius* occurred in the last 14,000 - 3,365 years, we concluded that these sister species present the highest rate of chromosomal evolution in Neotropical fish.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da biologia moderna é estabelecer quantas espécies existem e quais são seus padrões de distribuição. Embora a região Neotropical tenha o maior número de espécies de peixes de água doce do mundo (Schaefer, 1998), a escala temporal da taxa de diferenciação de caracteres dificilmente é objeto de estudo científico (exceto Dergam et al., 2002; Jacobina et al., 2011). A bacia do rio Doce, no sudeste brasileiro, está isolada da bacia do rio São Francisco pela Serra do Espinhaço, formada durante o pré-Cambriano (Saadi et al., 2002). Alguns dos afluentes destas bacias são bem próximos, como o rio das Velhas (tributário do rio São Francisco) e o rio Piracicaba (afluente da bacia do rio Doce). No médio rio Doce, o sistema de 150 lagoas oferece a condição única de vicariância conhecida nos neotrópicos. Estas lagoas formaram-se durante dois recentes ciclos geomorfológicos, o mais antigo entre 14.000-10.000 anos (Meis & Monteiro, 1979) e o mais recente entre 7.800 (+/- 250) a 3.365 (+/-155) anos (Tundisi & Meis, 1985). O sistema lacustre do médio rio Doce possui 1/3 de toda ictiofauna registrada para a bacia (Godinho & Vieira, 1998). No entanto, o conhecimento acerca da composição e distribuição da ictiofauna para a bacia não é adequadamente sistematizado. A maior parte dos estudos com peixes foi realizada na porção média do rio Doce, principalmente no Parque Estadual do Rio Doce – PERD e na área de entorno (Latini & Petrere, Jr., 2004; Espíndola et al., 2005, Vieira et al., 2000). Ainda nesse cenário, as invasões biológicas e alterações antrópicas estão levando a importante perda da biodiversidade na bacia do rio Doce. Das 77 espécies nativas conhecidas para a bacia, 37 são consideradas ameaçadas de extinção (Godinho & Vieira, 1998), sendo a introdução de peixes não nativos a principal ameaça à ictiofauna da bacia (Alves et al., 2007). Uma forma objetiva de orientar os esforços de conservação poderia estar baseada em padrões de distribuição de espécies endêmicas, mas a única espécie endêmica a esse sistema de lagoas é o caracádeo *Oligosarcus solitarius* Menezes, 1978, o qual tem a espécie-irmã, *Oligosarcus argenteus* Günther, 1864, restrito à calha e nascentes dos tributários do rio Doce (Menezes, 1978). Este estudo visa à caracterização morfológica, citogenética e molecular destas duas espécies.

O gênero *Oligosarcus* compreende 19 espécies (Mirande et al., 2011), distribuídas nas principais bacias hidrográficas sul americanas abaixo de 14° de latitude sul (Menezes, 2010). Os representantes do gênero *Oligosarcus* são peixes de pequeno a médio porte, habitantes típicos de riachos e ribeirões, e ocasionalmente, rios de grande porte. As espécies do gênero são carnívoras, variando de insetívoro a piscívora para algumas espécies (Hermes-Silva et al.,

2004). Como diversos grupos dentro da família Characidae, a filogenia e a taxonomia deste gênero são objeto de estudos (Mirande et al., 2011). Atualmente o gênero *Oligosarcus* encontra-se na condição de *incertae sedis* dentro da família Characidae (Lima et al., 2003). As espécies desse gênero possuem padrão de distribuição alopátrica, como observado em *O. argenteus* e *O. solitarius*. Exceções são *Oligosarcus robustus* (Menezes, 1969), *Oligosarcus oligolepis* (Steindachner, 1876) e *Oligosarcus jenynsii* (Günther, 1864) que ocorrem em simpatria nas planícies costeiras do Rio Grande do Sul e Uruguai (Menezes & Ribeiro, 2010).

*Oligosarcus argenteus* foi descrito por Günther (1864) com o Brasil sendo a localidade tipo. Menezes em 1964 descreveu *Oligosarcus meadi* com localidade tipo o município de União do Caeté, no rio Das Velhas, bacia do rio São Francisco. Uma revisão da sistemática do gênero Menezes (1987) descreveu *Oligosarcus solitarius*, com base em uma fêmea da lagoa Carioca e 39 parátipos de outras lagoas do médio rio Doce. A distribuição de *O. solitarius* é indicada como “restrita ao sistema de lagos do vale do Rio Doce em Minas Gerais,” e acrescenta: “Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as amostras provenientes dos diversos lagos da região”. Nesta mesma revisão, Menezes (1987) sinonimizou *O. meadi* e *O. argenteus*. Menezes (1978) considerou também o material coletado por Günther, proveniente do rio Cipó, já que “outras espécies descritas na mesma época por Günther (1961) foram coletadas naquele rio”. O autor considerou a distribuição de *O. argenteus* como “riachos formadores da drenagem do Rio Doce e da drenagem do Rio Das Velhas em Minas Gerais, Brasil”.

Dados citogenéticos são disponíveis para cinco das 19 espécies de *Oligosarcus* (Martinez et al., 2004; Kavalco et al., 2005; Centofante et al., 2006; Rubert & Margarido, 2007), demonstrando elevada variabilidade entre as espécies do gênero. Até hoje inexistem estudos filogenéticos baseados em dados moleculares que visem à análise de relações evolutivas entre as espécies de *Oligosarcus*, mas espécies do gênero frequentemente compõem outros estudos que incluem espécies da família Characidae (Calcagnotto et al., 2010; Javonillo et al., 2005).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 . OBJETIVO GERAL

Determinar os padrões de variação morfológica, citogenética e molecular de populações de *Oligosarcus* ssp. nas bacias hidrográficas do alto e médio rio Doce e alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 . OBJETIVO ESPECÍFICO

#### 2.2.1. Testar as seguintes hipóteses:

1.  $H_0$ : Os padrões de variação morfológica, citogenética e molecular entre as populações amostradas nas cabeceiras e no sistema lacustre do médio rio Doce e do rio Das Velhas são consistentes com a existência de duas espécies propostas por Menezes (1978).
2.  $H_1$ : Os padrões de variação morfológica, citogenética e molecular entre as populações amostradas indicam a existência de um número diferente de espécies da hipótese nula.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

Um total de 22 populações de *Oligosarcus* spp. foi analisado: 16 do médio rio Doce, cinco das cabeceiras do Rio Doce e uma na cabeceira do rio Das Velhas, bacia do rio São Francisco foram amostradas (Figura 1, Tabela 1). A bacia do rio Doce situa-se na região Sudeste do Brasil, entre os paralelos 18°45' e 21°15' de latitude sul e os meridianos 39°55' e 43°45' de longitude oeste no Estado de Minas Gerais. A cabeceira do rio Das Velhas encontra-se no município de Ouro Preto (20°19'30,92"S - 43°32'57,44"W) e a localidade de coleta encontra-se dentro da Área de Proteção Ambiental das Andorinhas (APA das Andorinhas).

#### 3.2 Análises morfológicas

As análises morfométricas foram realizadas em 171 espécimes de nove populações da bacia do rio Doce e uma população da bacia do rio São Francisco (Tabela 1). 18 caracteres merísticos e morfométricos foram utilizados, 10 dos quais foram propostos por Menezes (1987) (Tabela 2). Todos os espécimes foram medidos com paquímetro de 0,01mm de precisão. As contagens dos dentes, escamas e raios foram feitas com lupa binocular Olympus SZ40. As matrizes geradas foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) utilizando o software PAST v. 2. 01 (Hammer et al., 2010). Duas análises de PCA foram realizadas, a primeira considerando os 18 caracteres analisados neste trabalho, e a segunda considerando os quatro caracteres diagnósticos propostos por Menezes (1987).

#### 3.3 Análises citogenéticas

As informações citogenéticas foram obtidas em 90 espécimes de oito populações da bacia do rio Doce e uma da bacia do rio São Francisco (Tabela 1). A divisão celular foi estimulada *in vivo* com duas aplicações diárias de Aminovax®, um antígeno lisado comercialmente disponível. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões de células do rim anterior, utilizando o método proposto por Bertollo et al. (1978). Os peixes foram previamente anestesiados com óleo de cravo (Henyey et al., 2002). As colorações

incluíram uso de Giemsa, impregnação com nitrato de prata (Howell & Black, 1980) para localização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs). A heterocromatina foi visualizada com bandamento C (Sumner, 1972) com modificações. Os fluorocromos DAPI e Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) foram utilizadas para identificar regiões ricas em AT e GC respectivamente (Schweizen, 1980; Sola et al., 1992).

Três sequências de DNA repetitivos foram utilizadas como sondas. A primeira sonda de 5S rDNA incluiu 120 pares de bases (pb) do gene de codificação 5S rDNA e 200 bp do espaçador não transcrito (NTS) (Martins et al., 2006). As sondas 18S rDNA corresponderam a um segmento de 1400 pares de bases do gene 18S rDNA, obtido através de PCR a partir de DNA nuclear (Cioffi et al., 2009). Ambos os genes ribossomais foram isolados do genoma de *Hoplias malabaricus* previamente clonado em vetores plasmídicos e propagados em *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ . A sonda 5S rDNA foi marcada com biotina-14-dATP, enquanto a sonda 18S rDNA foi marcada com DIG-11-Duto, por nick translation, de acordo com as especificações do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha). A hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) e na detecção dos sinais de hibridização foram realizadas usando avidina-FITC (Sigma) para sondas 5S rDNA e anti-digoxigeninarodamina (Roche, Mannheim, Alemanha) para sondas os 18S rDNA. A FISH com as sondas de microssatélites foi realizada como descrito em Kubat et al. (2008). Utilizou-se o oligonucleotido d(CA)<sub>15</sub> marcado como sonda. Esta sequência foi diretamente marcada com Cy3 no terminal 5' terminal durante a síntese (realizada por Sigma St. Louis, MO, EUA). A hibridização *in situ* para a sonda de microssatélites foi realizada de acordo com Cioffi et al. (2011). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (1,2 ug/ml), montado na solução Antifade (Vector, Burlingame, CA, EUA) e analisados em microscópio de fluorescência Olympus BX50. Os cromossomos foram classificados segundo Levan et al. (1964), com base no índice relação de braços (RB = comprimento do braço maior / comprimento do braço menor) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st), e telocêntricos (t).

### 3.4 Análises moleculares

O DNA foi extraído de amostras de fígado e brânquias de 47 espécimes de 18 populações do rio Doce e da população do rio Das Velhas (bacia São Francisco) (Tabela 1). A extração de DNA foi realizada segundo Boyce et al., (1989). Os fragmentos de cytB (DNA mitocondrial) foram amplificados com os iniciadores GLU-5 (TGA TAT GAA AAA CCA

TCG) e CB23 (CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA). As reações foram feitas em volume de 50 µL contendo 10 µL de dNTPs (1 mM), 5 µL de tampão de reação (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM de KCl), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de cada iniciador (10 mM), 0,5 µL (2, 5 U) de Taq DNA polimerase (Phonectria), 2 µL de DNA molde (100 ng/mL) e 26,5 µL de H<sub>2</sub>O. As condições de PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 94°C (3 min), seguido de 41 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1min), 64°C (1 min) e um passo de extensão final a 64°C (7 min). Os produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick (Qiagen). Cada reação de sequenciamento foi composta por cinco microlitros do produto de PCR purificado e 10 µL de kit dRhodamine (PE Applied Biosystems). As sequências foram alinhadas utilizando CLUSTAL W 1,83 em MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). O programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para identificar os haplótipos presentes nas populações estudadas. A rede de haplótipos foi obtida com o programa Network 4.5.1.6 (<http://www.fluxus-technology.com>) utilizando a opção “Median joining” (Bandelt et al., 1999).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise morfológica

Dos 171 espécimes analisados, 128 foram caracterizados com *O. solitarius* (todos eles coletados no sistema lacustre do médio Rio Doce), 31 como *O. argenteus* (coletados nas cabeceiras dos rio Doce e rio Das Velhas); 12 deles (7%) apresentaram caracteres em mosaico, com caracteres intermediários entre *O. solitarius* e *O. argenteus* (Anexo VII). Estes indivíduos ocorreram em Viçosa (cabeceira do rio Doce) e nas lagoas Aguapé, Cristal, Ferrugem, Malba e Palmeiras (médio rio Doce).

A primeira análise de componentes principais considerando todos os caracteres morfológicos coletados, e a segunda análise, incluindo somente caracteres morfológicos propostos por Menezes (1987), reproduziram os mesmos agrupamentos. O PCA definiu três grupos: (1) espécimes coletados no sistema lacustre do médio rio Doce, (2) espécimes do alto rio Doce, e (3) espécimes coletados da cabeceira do rio Das Velhas (Figura 2 e 3). Os caracteres mais informativos foram: dentes no maxilar, dentes do dentário, escamas perfuradas na linha lateral, e dentes no ectopterigóide. Quando o PCA incluiu 10 caracteres, o PC1 e PC2 explicaram os quatro caracteres, demonstrando 78,32% da variância total, com a

contribuição de 0,69 número de dentes no maxilar, 0,50 número de dentes do dentário, 0,33 número de escamas perfuradas na linha lateral e 0,31 número de dentes do ectopterigóide. Utilizando os quatro caracteres considerados diagnósticos para separar *O. solitarius* e *O. argenteus* propostos por Menezes (1987): número de escamas perfuradas na linha lateral, número de dentes no maxilar, visibilidade dos dentes do pré-maxilar com boca fechada e, posição mandíbula-focinho, o percentual de variância explicado por PC1 e PC2 foi de 99,32%, com as contribuições de 0,91 número de dentes no maxilar, 0,79 a posição mandíbula-focinho a qual é atrasada em *O. solitarius* e acaba na mesma linha em *O. argenteus* e 0,41 escamas perfuradas pela linha.

Em termos de localidades, o fenótipo foi caracterizado da seguinte forma:

(1) espécimes das lagoas do médio rio Doce: número de escamas perfuradas na linha lateral variou entre 47-54; número de dentes na maxila variou entre 20-33; número de dentes do dentário variou entre 14-26 e número de dentes do ectopterigóide variou entre 8-15,

(2) espécimes do alto rio Doce: número de escamas perfuradas pela linha lateral variou entre 42-46; número de dentes na maxila variou entre 17-24; número de dentes do dentário variou entre 17-21 e número dentes do ectopterigóide variou entre 6-10, e

(3) espécimes coletados na cabeceira do rio Das Velhas: número de escamas perfuradas na linha lateral variou entre 44-47; número de dentes na maxila variou entre 13-17; número de dentes do dentário variou entre 13-17 e número de dentes do ectopterigóide virou entre 5-8.

#### 4.2 Análise cariotípica

Todas as populações apresentaram  $2n = 50$  cromossomos em ambos os sexos. No entanto, a maioria das populações foi caracterizada por fórmulas cariotípicas únicas, geralmente envolvendo o número de cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (Tabela 1).

As populações de *O. solitarius* apresentaram dois pares de cromossomos metacêntricos, 7 a 8 pares de submetacêntricos, 7 a 10 pares de subtelocêntricos e 6 a 9 pares de telocêntricos (Figura 4). As populações de *O. argenteus* apresentaram três pares de cromossomos metacêntricos, 6 a 7 pares de submetacêntricos, 8 a 11 pares de subtelocêntricos e 5 a 7 pares de telocêntricos (Figura 5). Considerando o padrão de Ag-NORs, *O. solitarius*, incluindo os espécimes “mosaico”, apresentou um par de Ag-NORs

teloméricas no braço menor em um par de submetacêntricos (Figura 6). Já as populações de *O. argenteus* de Viçosa e rio Casca apresentaram dois pares de cromossomos portadores de Ag-NORs: um par de submetacêntricos com Ag-NORs telomérica no braço menor e um par de submetacêntricos com Ag-NORs teloméricas no braço maior. Um terceiro perfil de Ag-NORs ocorreu na população do rio Das Velhas (Ouro Preto), a qual apresentou um par de submetacêntricos com Ag-NORs teloméricas no braço maior e um par de submetacêntricos com Ag-NORs biteloméricas (Figura 7).

A técnica de bandamento C foi bem sucedida apenas em espécimes das populações de *O. solitarius* da lagoa Alméciga e de *O. argenteus* de Viçosa. A população de *O. solitarius* apresentou regiões heterocromáticas centroméricas e teloméricas enquanto a população de *O. argenteus* apresentou regiões heterocromáticas centroméricas e biteloméricas (Figura 8).

Os locais marcados com CMA<sub>3</sub> coincidiram com os sítios Ag-NORs: as populações de *O. solitarius* apresentaram marcações no braço menor de um par de submetacêntricos e as populações de *O. argenteus* apresentaram de quatro a seis marcações (Figura 9 e 10). A coloração com DAPI mostrou regiões cromossômicas ricas em AT no braço curto de um par de cromossomos subtelo-cêntricos nas populações de *O. solitarius* (Figura 9) enquanto as populações de *O. argenteus* não apresentaram esses sítios.

A sonda 5S rDNA marcou o par 12 (st), na região telomérica do braço curto do cromossomo, em todas as populações estudadas. Por outro lado, o padrão de sítios 18S rDNA mostrou diferenças entre as populações. Em todas as populações consideradas *O. solitarius*, os espécimes apresentaram 10 marcações. Em populações de *O. argenteus*, as populações de Viçosa e Coimbra apresentaram 10 marcações, mas as populações de rio Casca e de Ouro Preto (rio Das Velhas) apresentaram doze marcações (Figuras 11). Porém, dentro de *O. solitarius*, essas marcações também caracterizaram diferentes populações. Nas lagoas Aguapé e Linguíça, as sondas de 18S rDNA apareceram em um par de cromossomos subtelo-cêntricos com marcações teloméricas no braço curto (par número 10) e três pares de cromossomos telocêntricos, sendo uma delas, com marcação bitelomérica (par número 18 nas lagoas Aguapé e Linguíça), uma marcação telomérica no braço curto (par número 19 nas lagoas Aguapé e Linguíça), uma marcação telomérica no braço longo (par número 20 na Lagoa Aguapé) e uma marcação telomérica no braço curto (par número 20 na Lagoa Linguíça).

As populações de *O. argenteus* de Viçosa e Coimbra (alto rio Doce), apresentaram marcações teloméricas no braço curto em um par de cromossomos metacêntricos (par número 1 em população de Coimbra), marcando três pares de cromossomos subtelo-cêntricos com

marcações teloméricas no braço curto (pares número 11, 14 e 16 em Viçosa), uma marcação bitelomérica (par número 18 em Coimbra e par 19 em Viçosa), uma marcação telomérica no braço curto (par número 20 em Coimbra) e uma marcação telomérica no braço longo (par número 22 em Coimbra) (Figura 11). Já as populações de *O. argenteus* do rio Casca (alto rio Doce) e Ouro Preto (rio Das Velhas) apresentaram um segundo padrão, com 12 marcações da sonda 18S rDNA, mas em diferentes localizações nos cromossomos. A população de rio Casca apresentou um par de cromossomos submetacêntricos com marcações teloméricas no braço longo (par número 9) e em quatro pares de cromossomos subtelo-cêntricos, com marcações teloméricas no braço curto (pares número 10, 14 e 16) e um par de cromossomos com marcações biteloméricas (par número 11). A população de Ouro Preto apresentou a mesma sonda em dois pares de cromossomos submetacêntricos, com marcações teloméricas no braço curto (par número 4) e no braço longo (par número 7), duas marcações nos cromossomos subtelo-cêntricos, um par com marcações teloméricas no braço curto (par número 13) e um par com marcações biteloméricas (par número 11), e uma marcação nos cromossomos telocêntricos, com marcações teloméricas no braço curto (par número 21) (Figura 11).

Um estudo piloto realizado com sondas fluorescentes de sequências de microssatélites (CA)<sub>15</sub> foi realizado nas mesmas populações. Foram evidenciadas marcações teloméricas, biteloméricas e centroméricas em grande parte dos cromossomos das quatro populações estudadas, sendo estas marcações em sua maioria encontradas nos cromossomos submetacêntricos, subtelo-cêntricos e telocêntricos, mas sem diferenças conspícuas entre as populações (Figura 12).

#### 4.3 Análises moleculares

As reações de sequenciamento permitiram o alinhamento de 390 pares de bases de *cytb* em 47 espécimes coletados nas 20 populações estudadas. Nove sítios variáveis foram observados, gerando 10 haplótipos e uma diversidade haplotípica ( $H_d$ ) de 0,6670. O haplótipo 1 (H1) foi encontrado em 14 das 20 populações amostradas, não ocorrendo apenas no rio Das Pacas e na lagoa Linguíça. O segundo haplótipo em termos de frequência foi H5, o qual ocorreu nas lagoas Ferrugem, Tiririca, Timburé e em Ponte Nova (alto rio Doce); nestas duas últimas localidades, em simpatria com H1. O haplótipo H10 ocorreu no rio das Pacas e no rio Piracicaba. Finalmente, os espécimes coletados na lagoa Linguíça apresentaram um haplótipo

exclusivo (H4). A rede de haplótipos mostra que sete haplótipos são formas derivadas de H1 e outros dois eram derivados de H5, diferenciando-se em apenas uma substituição em diferentes regiões do fragmento *cytb* (Figura 13, Tabela III). A estimativa média de fluxo gênico entre todas as populações estudadas (índice *Fst*) foi de 0,509. A estimativa de fluxo gênico entre as 16 populações estudadas par a par permitiu observar que as lagoas Linguíça e Tiririca apresentaram índices *Fst* mais elevados, sugerindo um grau maior de isolamento dessas lagoas (Tabela IV).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Padrões de variação morfológica

A PCA indica três agrupamentos congruentes com padrões de distribuição geográfica, mas que são inconsistentes com a ocorrência de duas espécies nas duas bacias estudadas. As diferenças morfológicas entre as populações de *O. argenteus* do alto rio Doce e rio Das Velhas não foram indicadas na revisão do gênero realizada por Menezes (1987), possivelmente porque a amostragem não incluiu a população do rio Das Velhas. Neste trabalho, o autor avaliou 35 espécimes coletados no município de Viçosa (alto rio Doce), 10 coletados em afluentes do rio Paraopeba (alto São Francisco), um no lago da Serra do Caraça e dois espécimes no ribeirão do Carmo (alto rio Doce). Os padrões morfométricos encontrados confirmaram que os caracteres diagnósticos indicados por Menezes (1987) permitem a separação de *O. solitarius* e *O. argenteus* dentro da bacia do rio Doce. No entanto, a sobreposição do número de escamas acima e abaixo da linha lateral, as séries horizontais de escamas ao redor do pedúnculo caudal e os rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial sugerem que estes caracteres não são diagnósticos. Porém, outros caracteres utilizados por Menezes (1987) como número de escamas perfuradas na linha lateral, o número de dentes no maxilar e a posição mandíbula-focinho são caracteres mais informativos para individualizar *O. solitarius* e *O. argenteus*.

A evidente diferença entre populações do rio Doce e do rio Das Velhas, consideradas como *O. argenteus* por Menezes (1978) sugere a necessidade de reavaliação do material tipo coletado por Günther (1864). Se aquele material tipo se assemelha aos padrões de variação da bacia do rio Doce, é possível que a população do rio Das Velhas seja uma espécie ainda não descrita. Se por outro lado, o tipo se assemelha ao material do rio Das Velhas, possivelmente

*O. meadi*, com localidade tipo União de Caeté poderá ser validada. A ocorrência de populações de *Oligosarcus* na bacia do rio Cipó, afluente do rio Das Velhas não foi confirmada em levantamentos recentes (Vieira, com. pess.).

Na bacia do rio Doce, análises morfométricas e merísticas em populações de *Astyanax bimaculatus* apresentaram diferenças entre localidades, dentro da drenagem (Paiva et al., 2006). Na bacia do rio Tibagi, resultados semelhantes foram observados em populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* isoladas em lagos do Parque Estadual de Vila Velha, na bacia do rio Tibagi (estado do Paraná), com significativa discriminação em análise de componentes principais (PCA) (Shibatta & Artoni, 2005). Resultados semelhantes foram observados em populações de *Astyanax fasciatus* nas bacias dos rios Mogi-guaçu e Paranapanema, SP, onde análises morfométricas e citogenéticas demonstraram a presença de dois citótipos, sugerindo a separação em dois grupos (Pazza et al., 2008).

## 5.2 Variabilidade citogenética

O número diplóide conservado, observado nas 13 populações de *Oligosarcus* avaliadas neste trabalho reforça a uniformidade cromossômica, considerada pleiomórfica para a família Characidae (Oliveira et al., 1988) e provavelmente também para os Characiformes (Dergam, com. pess.). As variações cromossômicas que não alteram o número diplóide estão associadas a rearranjos cromossômicos como inversões (paracêntricas e pericêntricas), sendo todos eles rearranjos cromossômicos envolvidos em processos que levam à especiação (White, 1978; King, 1993; Faria et al., 2010).

O alto grau de diversidade cariotípica observado é inédito para as espécies de peixes de água doce na bacia do rio Doce e para o gênero *Oligosarcus* na região neotropical. Porém, a revisão de literatura demonstra que apenas uma pequena proporção de trabalhos realizados foram publicados em revistas indexadas. Estudos citogenéticos do gênero *Oligosarcus* incluíram as espécies *O. jenynsii* (Falcão & Bertollo, 1985), *O. hepsetus* (Falcão & Bertollo, 1985; Kavalco et al., 2005; Centofante et al., 2006), *O. longirostris* (Martinez et al., 2004; Rubert et al., 2007), *O. macrolepis* (Falcão & Bertollo, 1985), *O. pintoï* (Falcão & Bertollo, 1985; Rubert et al., 2007) e *O. paranensis* (Martinez et al., 2004; Rubert & Margarido, 2007) (Tabela V).

Todas as espécies apresentam número diplóide de 50 cromossomos. Em relação a *O. hepsetus* e *O. longirostris*, os dados apresentados por Martinez et al., (2004), Kavalco et al., (2005), Centofante et al., (2006) e Robert et al., (2007), mostram variações interespecíficas das fórmulas cariotípicas em *O. hepsetus* e *O. longirostris*. Vale ressaltar que as populações de *O. hepsetus* estudadas por Centofante et al., (2006) e nas populações de *O. paranensis* e *O. pintoii* estudadas por Rubert & Margarido, (2007) em sua classificação cromossômica nos pares acrocêntricos (neste trabalho usamos a nomenclatura telecêntricos), não condiz com padrão de classificação estabelecido neste trabalho. Centofante et al., (2006), descrevem nove pares de acrocêntricos, porém o primeiro (par número 17) apresenta braços curtos, o mesmo é observado nos cromossomos das populações de *O. paranensis* e *O. pintoii*, sendo em *O. paranensis* nos pares de número (23 e 24), e em *O. pintoii* nos pares de número (21, 23 e 24), neste trabalho interpretado como sendo subtelocêntrico. Assim, as populações de *O. hepsetus* apresentariam apenas oito pares de cromossomos telocêntricos, aumentando ainda mais a diferença na fórmula cromossômica encontrada nas diferentes populações pertencentes à bacia do rio Paraíba do Sul, e diferenciando as fórmulas cariotípicas entre as populações estudadas por Rubert & Margarido, (2007), onde os autores descrevem a mesma fórmula cromossômica para três populações do gênero *Oligosarcus*, *O. paranensis*, *O. pintoii* e *O. longirostris*. Considerando o grau de diferenciação cromossômica observado no presente trabalho, cada espécie apresentaria fórmulas cariotípicas distintas. O mesmo grau de variação foi observado entre as populações de *Oligosarcus* da bacia do rio Doce e do São Francisco.

Outros gêneros dentro da família Characidae apresentam este tipo de diferenciação quanto à fórmula cromossômica, encontrado nos gêneros *Astyanax* e *Brycon*, onde é conservado o número diplóide, mas com algumas alterações na fórmula cariotípica (Kavalco et al., 2005).

Nas espécies de *Oligosarcus* estudadas citogeneticamente, o padrão das marcações das Ag-NORs varia de uma a cinco marcações dentro e entre as espécies (Tabela V). Estas diferenças no número de sítios ribossomais podem ser atribuídas a rearranjos cromossômicos. A presença de dois pares de cromossomos metacêntricos em *O. solitarius* e três pares em *O. argenteus* e distintos padrões de marcação de Ag-NORs (um par em *O. solitarius* e dois pares em *O. argenteus*) sugere isolamento reprodutivo entre as espécies. Variações envolvendo o número de Ag-NORs também são observadas entre *Oligosarcus*. Um par de Ag-NORs foi encontrado em populações de *O. hepsetus* (Falcão, 1983; Kavalco et al., 2005), e de *O. longirostris* (Rubert e Margarido, 2007). Porém, Ag-NORs múltiplas também foram indicadas

*O. hepsetus* (Centofante et al., 2006), *O. longirostris* (Martinez et al., 2004), assim como em *O. pintoii*, (Rubert e Margarido, 2007) e *O. paranaensis*, (Martinez et al., 2004; Rubert e Margarido, 2007), demonstrando diferenças significativas no número de marcações encontradas em diferentes populações.

Nossos resultados indicaram que as Ag-NORs coincidiram com as regiões heterocromáticas, conforme o observado em *O. hepsetus* (Kavalco et al., 2005). No entanto, a marcante diferença no padrão heterocromática de *O. solitarius* com *O. argenteus* consiste na presença de regiões heterocromáticas biteloméricas nesta última, inédita para o gênero. A observada sobreposição das regiões heterocromáticas com regiões CMA<sub>3</sub> positivas é uma condição comumente encontrada em Characidae (Ferro et al., 2001).

Alterações no padrão de distribuição da heterocromatina no gênero *Oligosarcus* são comuns (Centofante et al., 2006), sendo que na bacia do rio Doce foram também observadas entre a população da lagoa Alméciga (médio rio Doce) caracterizada como *O. solitarius* e a população do município de Viçosa (alto rio Doce) caracterizada como *O. argenteus*. O padrão de diferenciação heterocromática de *O. solitarius* assemelha-se ao de *O. paranensis*, o qual também mostrou uma grande quantidade de heterocromatina, com blocos visíveis localizados na região terminal dos braços longos dos cromossomos telocêntricos. Esta disposição difere da encontrada em *O. pintoii* e *O. longirostris*, apresentando pequenas quantidades de heterocromatina associadas com Ag-NORs. Em *O. paranensis*, a grande quantidade de heterocromatina distribuída ao longo de vários cromossomos, apresentando conspícuos blocos terminais de heterocromatina, foi interpretada como resultado de um mecanismo de dispersão por translocações (Rubert & Margarido, 2007).

A população de *O. argenteus* do município de Viçosa (alto rio Doce), apresentou blocos de heterocromatina teloméricas, biteloméricas e pericentroméricas, sendo esta última observada em populações de *O. hepsetus* da bacia do rio Paraíba do Sul (Kavalco et al., 2005; Centofante et al., 2006).

A presença de heterocromatina em regiões pericentromérica e peritelomérica facilita o intercâmbio entre cromossomos não homólogos, com posterior amplificação, sugerindo que a heterocromatina frequentemente desempenha um papel importante na evolução cromossômica em peixes (Galetti et al., 1991; Margarido & Galetti, 1999). As mudanças de padrões ocorrem em *Hoplias malabaricus* em breves períodos de vicariância, conforme observado em lagoas do médio rio Doce (Jacobina et al., 2011).

As variações cromossômicas parecem estar relacionadas com a mobilidade e tamanho populacional (Sites & Moritz, 1987). Assim, grupos de peixes que apresentam um tamanho populacional elevado tendem a conservar a macroestrutura cariotípica, tais como Prochilodontidae (Bertollo et al., 1986), Curimatidae (Venere & Galetti, 1989), Anostomidae (Galetti et al., 1991), Salmininae e Bryconinae (Margarido & Galetti, 1999). O contrário ocorre em populações aparentemente pequenas e isoladas em cabeceiras, como *Astyanax scabripinnis* (e.g. Moreira & Bertollo, 1991).

As marcações das regiões ricas em GC realizadas pela técnica de CMA<sub>3</sub> foram observadas nas populações de *O. solitarius* pertencentes às lagoas Hortência e Linguíça (médio rio Doce) marcando um par de cromossomos subtelocêntricos no braço curto (Figura 9). O mesmo padrão foi observado em populações de *O. hepsetus* pertencentes a bacia do rio Paraíba do Sul (Kavalco et al., 2005). Este padrão de marcação é comumente achado em espécies do *Astyanax* (Ferro et al., 2001; Kavalco., 2003).

Na localização das regiões ricas em AT realizadas pela técnica de DAPI, somente a população de *O. solitarius* da lagoa Tiririca apresentou um par de marcações, reforçando a singularidade genética apresentada em análises moleculares (Figura 9). Esta característica parece ser comum nos characiformes, embora as regiões ricas em AT também sejam relatadas em peixes loricarídeos (Artoni & Bertollo, 1999).

Diferenças nas fórmulas cromossômicas entre populações dentro da mesma bacia hidrográfica também foram observadas em populações de *Trichomycterus paolence*, do rio Capivara (Botucatu, SP) tributários do rio Tietê, e um mosaico em Itatinga, estado de São Paulo (Torres et al., 1998; Torres et al., 2002), e em *A. altiparanae*, dos rios Índios (bacia Ivaí) e rio Paraná na região de Porto Rico (bacia do Paraná) (Fernandes & Martins-Santos, 2003).

A diferença nas fórmulas cariotípicas encontradas nas populações de *O. argenteus* dos municípios de Ouro Preto (rio Das Velhas), rio Casca e Viçosa (alto rio Doce), pode ser um reflexo do isolamento proporcionado pela Cadeia do Espinhaço.

Estudos relacionados foram realizados na ictiofauna nos rios Tietê e Paranapanema (bacia do rio Paraná), onde *Oligosarcus pinto* e *O. paranensis* ocorrem restritos aos riachos de terceira ordem, evitando a calha principal do rio (Caramaschi, 1986). Centofante et al. (2006) interpretaram que o mesmo pode ocorrer com populações de *O. hepsetus*, as quais poderiam estar isoladas pela calha principal do rio Paraíba do Sul. Nessas condições, esta

espécie ocorreria em pequenas populações isoladas, uma condição que tende a favorecer a fixação de rearranjos cromossômicos.

Considerando que a população de *O. argenteus* do rio Das Velhas apresenta o tipo de haplótipo mais abundante da bacia do rio Doce, é evidente que a presença desta espécie na bacia do rio das Velhas é um evento recente e deve-se a uma dispersão de uma população da bacia do rio Doce, onde existem 10 haplótipos. Embora se desconheça o evento específico de captura entre a cabeceira do rio Piracicaba e o rio Das Velhas, ela pode ter ocorrido de forma concomitante com a falha geológica de Caratinga (Saadi, 2002), a qual foi ativa nos últimos 50.000 anos.

Considerando os efeitos da vicariância, vale ressaltar que o caso mais extremo de isolamento está representado, na bacia do rio Doce, pela Lagoa linguíça, a qual apresentou um haplótipo único e fixado e um cariótipo exclusivo (Figura 19).

A ausência de variação nos sítios 5S rDNA entre populações de *O. solitarius* e *O. argenteus* sugere que esta sonda não seja adequada para resgatar variabilidade citogenética entre populações recentemente isoladas. A falta de variabilidade de sítios 5S rDNA parece ser comum entre os Characiformes, incluindo os da família Anostomidae (Martins & Galetti Jr, 2001), e os gêneros *Brycon* e *Astyanax* (Wasko et al., 2001; 2002; Kavalco et al., 2004).

A presença de três pares de cromossomos com sítios de 18S rDNA teloméricos e um par bitelomérico sugere que essa é uma característica pleisomórfica nas populações de *Oligosarcus* spp. da bacia do rio Doce. Nesse sentido, a observação de uma marcação bitelomérica presente em todas as populações estudadas, variando, porém a sua posição nas diferentes populações, e um par a mais de cromossomos subtelocêntricos com marcações 18S rDNA teloméricas no braço curto nas populações de *O. argenteus* de Ouro Preto e rio Casca seria resultado de um processo rápido de diferenciação que envolveria rearranjos cromossômicos e eventos de duplicação ou de perda de marcações.

As populações de *O. hepsetus* dos rios Paraitinga e Jucuí ( bacia do Paraíba do Sul) apresentaram quatro sinais positivos com a sonda 18S rDNA(Kavalco et al., 2005), outros trabalhos realizados nas populações de *O. hepsetus* da mesma bacia, nos ribeirões Grande e Santo Antônio apresentaram dois padrões de marcação 18S rDNA, ribeirão Grande apresentou quatro marcações, enquanto que o rio Santo Antônio apresentou seis marcações positivas (Centofante et al., 2006), existindo assim uma diferenciação significativa entre as populações de *O. hepsetus* da bacia do rio Paraíba do Sul.

### 5.3 Variabilidade molecular

A falta de resolução entre *O. solitarius* e *O. argenteus* utilizando o fragmento citocromo B e a falta de uma estruturação filogeográfica entre as populações é reflexo do pequeno tempo de divergência entre estas espécies (Awise, 2004).

A ampla distribuição do haplótipo 1, presente em 14 populações, sugere que este seja o haplótipo coalescente para as populações de *O. solitarius* e *O. argenteus* avaliadas. Os nove sítios variáveis nos 390 pb do fragmento citocromo B acumulam substituições desde o isolamento pleistocênico das populações de *Oligosarcus* spp, refletindo-se na diversidade haplotípica observada ( $H = 0,6670$ ). A estimativa de fluxo gênico ( $F_{st}$ ) de 0,509 sugere a existência de fluxo gênico em grande parte das populações de *O. solitarius* estudadas (Tabela IV). A comunicação entre as lagoas e a calha principal do rio Doce, através de pequenos canais explicaria a estimativa de fluxo gênico observada, exceto, conforme mencionado anteriormente, a Lagoa Linguíça (Anexo II). A lagoa Tiririca também apresenta altos valores  $F_{st}$  (Tabela IV).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados citogenéticos e moleculares deste trabalho corroboram parcialmente a hipótese da existência de duas espécies-irmãs de origem recente, *O. solitarius* e *O. argenteus* na bacia do rio Doce, mas demonstram que as populações apresentam níveis de diferenciação cromossômica semelhante à indicada para outras espécies do mesmo gênero. Contudo, os dados merísticos e morfométricos, incluindo os 13 propostos por Menezes (1978), indicaram diferenças significativas entre as populações de *Oligosarcus* da bacia do rio Doce e a da cabeceira do rio Das Velhas. Menezes (1978) considerou o rio Cipó, afluente da bacia do rio São Francisco como a localidade tipo mais provável de *O. argenteus*. O mesmo autor não encontrou diferenças morfológicas entre o material coletado por Günther em 1861 e o material do rio Doce sinonimizando assim, *O. meadi* com *O. argenteus*. Porém, nossos dados apontam a existência de diferenças morfológicas significativas entre as populações do alto rio Doce e a do rio das Velhas, sendo necessária a reavaliação do material tipo coletado por Günther. O conjunto de dados morfométricos, citogenéticos e moleculares sugere que existam duas espécies de *Oligosarcus* na bacia do rio Doce e uma terceira espécie na bacia do rio São Francisco.

O conhecimento dos eventos paleohidrológicos responsáveis pela provável captura de cabeceira entre as bacias do rio Doce e São Francisco, e os eventos paleohidrológicos indicados para as lagoas do médio rio Doce afetaram as populações de *Oligosarcus* sugerindo que a fixação das diferentes fórmulas cariotípicas encontradas na bacia ocorreu nos últimos 14.000 – 3.365 anos.

Dessa forma, foi confirmada a existência de *O. solitarius*, única espécie endêmica conhecida do sistema lacustre do médio rio Doce e foi demonstrado que as espécies-irmãs *O. solitarius* e *O. argenteus* apresentam a mais alta taxa de evolução cromossômica dos peixes neotropicais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves CBM, Vieira F, Magalhães ALB, Brito MFG (2007) Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: Bert MT, editor. Ecological and Genetic Implication. Florida: Springer. pp. 291-314
- Artoni MR, Vicari MR, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2009) Karyotype diversity and fish conservation of southern from South Brazil. Review in fish biology and fisheries, 19: 393-401.
- Artoni RF, Bertollo LAC (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Genetica, 106: 209-214.
- Avice JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution, 2nd edn. Sunderland: Sinauer Associates, Incorporated Publishers.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. Journal of Fish Biology, 28: 153-159.
- Bertollo LAC, Takahashi CS & Moreira-Filho, O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética 1: 103-120
- Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. Genetics, 123: 825-836
- Calcagnotto D, Schaefer S A, DeSalle R (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. Molecular Phylogenetics and Evolution, 36: 135-153.

- Caramaschi EP (1986) Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Doctor's Thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2006) Chromosomal Differentiation between Populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from Small Tributaries at Opposite Margins of the Paraíba do Sul River (Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 6: 981-987.
- Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011) The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132: 289-296.
- Cioffi M B, Martins C, Centofante L, Jacobina, Bertolla, LAC (2009) Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic and Genome Research*, 125: 132-141.
- Dergam JA, Paiva SR, Schaeffer C E, Godinho AL, Vieira F (2002) Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in Southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 379-387.
- Drummond MG, Martins SC, Machado MBA, Sebaio AF, Antonini Y (2005) Biodiversidade Minas Gerais: um atlas para sua conservação. 2ª ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Espíndola ELG, Branco MBC, Fracácio R, Guntzel AM, Moretto EM, Pereira RHG, Rietzler AC, Rocha O, Rodgher S, Smith WS, Tavares KS (2005) Organismos aquáticos. In: Rambaldi DM, Oliveira DAS, editors. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. 2ª. Ed. Brasília: MMA/SBF. pp. 202- 238.
- Falcão JN (1983) Estudos citogenéticos em Acestrorhynchinae e Cynopotaminae (Pisces, Characidae). Master's Thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Falcão JN, Bertollo LAC (1985) Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces: Characidae). *Journal of Fish Biology*, 27: 603-610.
- Faria R, Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 660-669.

- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2004) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, 141: 328-332.
- Ferro DAM, Neo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Nucleolar organizing regions, 18 S and 5 S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.
- Forster P, Bandel HJ, Rohl A (2000) NETWORK 3.1.1.0. Software free available at: [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com). Fluxus Technology Ltd., Cambridge.
- Galetti Jr PM, Mestriner CA, Venere PC, Foresti F (1991) Heterochromatin and Karyotypic reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenetic Cell Genetic*, 56: 116-121.
- Godinho AL, Vieira F (1998) Ictiofauna. Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade do Estado de Minas Gerais. In: Costa, Hermann CMR, Martins CS, Lins LV, Lamas IR, editors. *Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua Conservação*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. pp. 44-46.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2010) PAST – PAleontological STatistics version 2.05 Computer program available online at: <http://folk.uio.no/ohammer/past>. Accessed 12 December 2010.
- Henye E, Kynard B, Zhuang P (2002) Use of electronarcosis to immobilize juvenile lake and short-nose sturgeons for handling and the effects on their behaviour. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 502-504.
- Hermes-Silva S, Meurer S, Zaniboni-Filho E (2004) Biologia alimentar e reprodutiva do peixe-cachorro (*Oligosarcus jenynsii* Günther, 1864) na região do alto rio Uruguai - Brasil. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 26: 175-179.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizing regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015
- Jacobina UP, Paiva E, Dergam JA (2011) Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil *Neotropical Ichthyology*, 9: 325-333.
- Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 498-511.

- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Gene mapping of 5 S rDNA in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 107-110.
- Kavalco K F, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica*, 124: 85-91.
- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*, Cambridge University Press.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.
- Latini AO (2004) Alien fish in river Doce State Park, Brazil and native fish extinction in tropical lakes; Proposal for alien species management. *Aliens*, 19:23.
- Latini AO, Petrere, Jr. M (2004) Reduction of a native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 11: 71-79.
- Levan A, Fregda K, Sandberg, A.A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 210-220.
- Librado P, Rozas, J (2009) DnaSP v 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JF, Pezzi, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF (2003) Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs. pp. 106-169.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109: 161-168.
- Margarido VP, Galetti Jr P M (1999) Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22: 357-361.
- Martinez ER M, Oliveira C, Julio-Junior H (2004) Cytogenetic analysis of species of the genera *Acestrorhynchus*, *Oligosarcus* and *Rhaphiodon* (Teleostei: Characiformes). *Caryologia*, 57: 294-299.

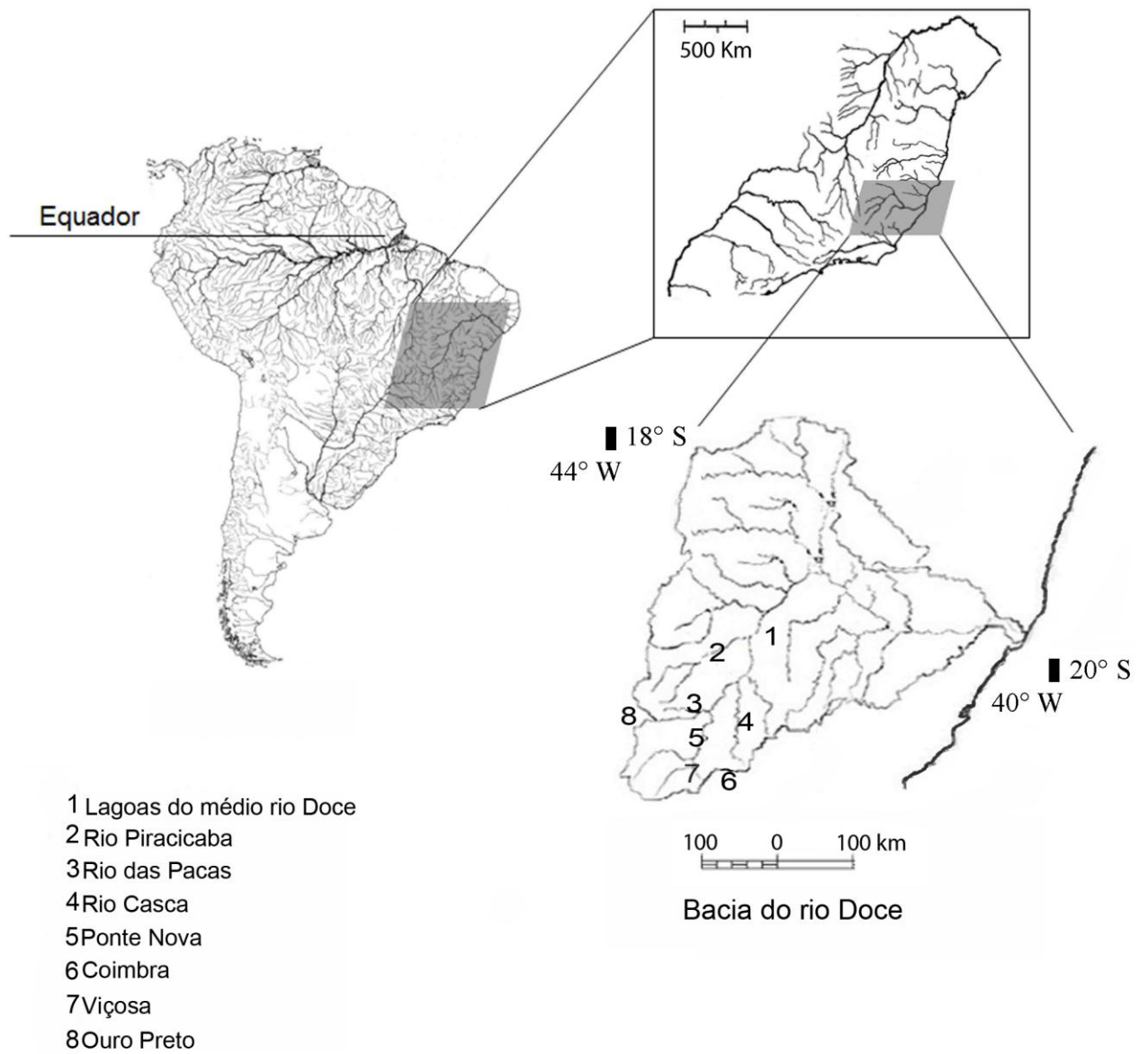
- Martins C, Galetti Jr PM (2001) Organization of 5 S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127: 133-141.
- Meis MRM, Monteiro AMF (1979) Upper Quaternary “rampas”, Rio Doce Valley: S. E. Brazilian plateau. *Zusammenfassun für Geomorphologie*, 23: 132-151.
- Menezes NA (1988) Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei; Characidae) from central and southern South America. In: Heyers, W.R & Vanzolini P E, editors. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. pp. 295-304.
- Menezes NA (1987) Três espécies novas de *Oligosarcus* Günther, 1864 e redefinição taxonômica das demais espécies do gênero (Osteichthyes, Teleostei, Characidae). *Boletim de Zoologia*, Universidade de São Paulo, 11: 1-39.
- Mirande MJ, Aguilera G, Azpelicueta MLM (2011) A threatened new species of *Oligosarcus* and its phylogenetic relationships, with comments on *Astyanacinus* (Teleostei: Characidae). *Zootaxa*, 2994: 1-20.
- Molina W. F (2001) An alternative method of mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5: 149-152.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 331-357.
- Oliveira, C, Toledo LFA, Foresti F, Britski HA, Toledo Filho, SA (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 11: 577-624.
- Paiva SR, Dergam JA, Machado F (2006) Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia*, 560: 393-404.
- Pinkel D, Straume, T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934-2938.
- Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (2006). *Fish Cytogenetics*. 1<sup>a</sup> ed. Enfield: Science Publishers.

- Rosa RS, Lima FCT (2005) Peixes. In: Machado, A. B. M., Martins, C. S & Drummond, G. M, editors. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. pp. 65-81.
- Ribeiro CA (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4: 225-246.
- Ribeiro C A, Cavallaro MC, Froehlich O (2007) *Oligosarcus perdido* (Characiformes, Characidae), a new species of freshwater fish from Serra de Bodoquena, upper Rio Paraguay basin, Brazil. *Zootaxa*, 1560: 43-53.
- Rubert M, Margarido PV (2007) Cytogenetic studies in three species of the genus *Oligosarcus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50:127-135.
- Saadi A, Machette MN, Haller KM, Dart RL, Bradley L, AMPD (2002) Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. U.S. Geological Survey, Open-File Report 02-230. (available at <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230>).
- Sites Jr J W, Moritz C (1987) Chromosomal Evolution and Speciation Revisited. *Systematic Zoology*, 36: 153-174.
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60: 229-235.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Shibatta AO, Artoni RF (2005) Sobre a identidade das populações alopátricas de *Astyanax* (characiformes, characidae) das formações furna 1 e furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, 11: 7-12.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 603 p.

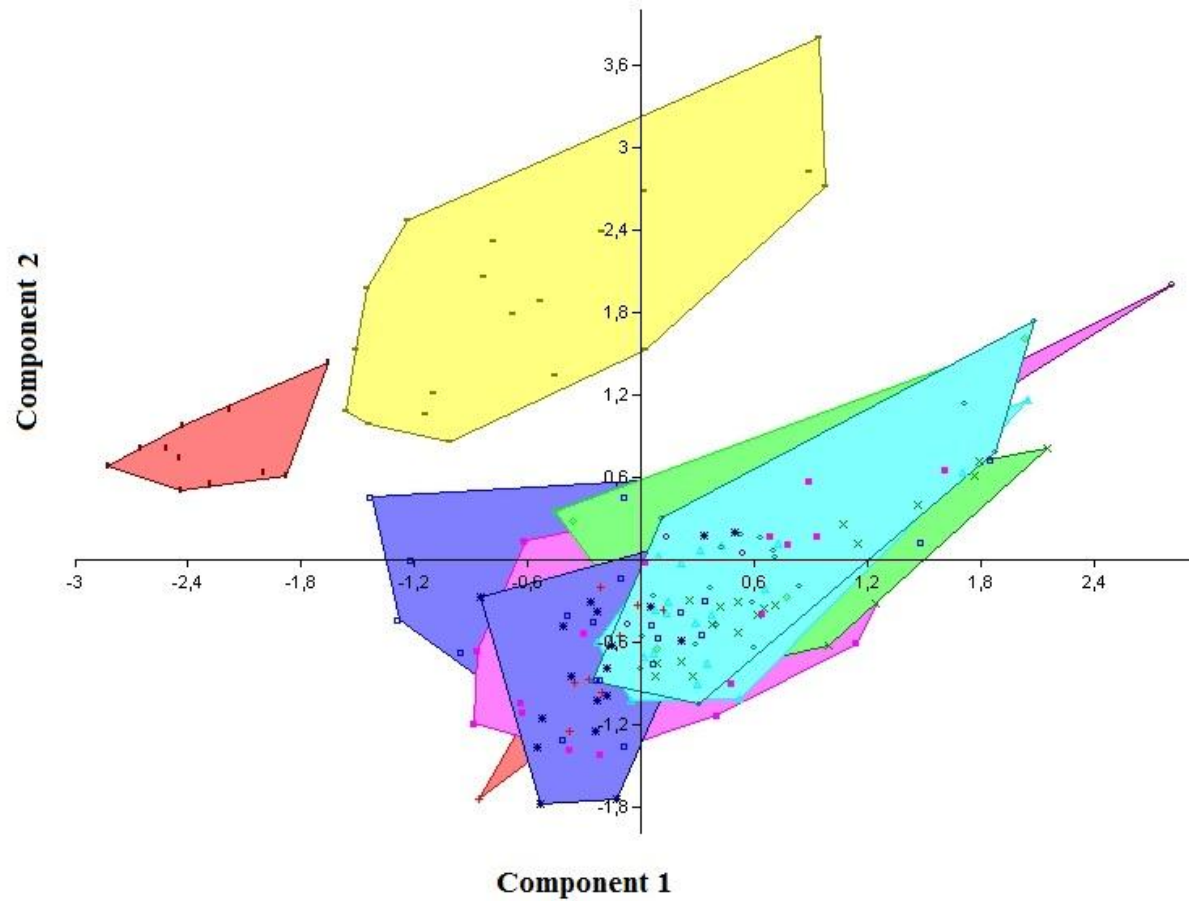
- Tamura KPD, Peterson NSG, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Torres RA, Foresti F, Oliveira C (1998) Comparative cytogenetic studies in allopatric populations of *Tricomyscus paolence* (Siluriformes, Tricomyscidae). *Cytologia*, 63: 107-114.
- Torres RA, Foresti F, Oliveira C (2002) Occurrence of karyotypical mosaicism in *Tricomyscus paolence* (Teleostei, Tricomyscidae). *Caryologia*, 55: 283- 287.
- Tundisi JG, Meis MRM (1985) Geomorphology and limnological processes at the Middle Rio Doce Valley lakes. In: Water Research Institute, Limnological Studies in Central Brazil (1st Report). Chikusa-ku: Nagoya University. pp. 11-17.
- Vieira F, Alves CBM, Santos GB (2000) Rediscovery and first record of *Henochilus wheatlandii* (Teleostei: Characiformes) a rare neotropical fish, in rio Doce basin of southeastern Brazil. *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, 11:201-206.
- Venere P C, Galetti Jr PM (1989) Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Revista Brasileira de Genética*, 12: 17-25.
- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM (2001) Molecular organization of 5 S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44: 893-902.
- White MJD (1978) *Modes of Speciation*, WH Freeman.

---

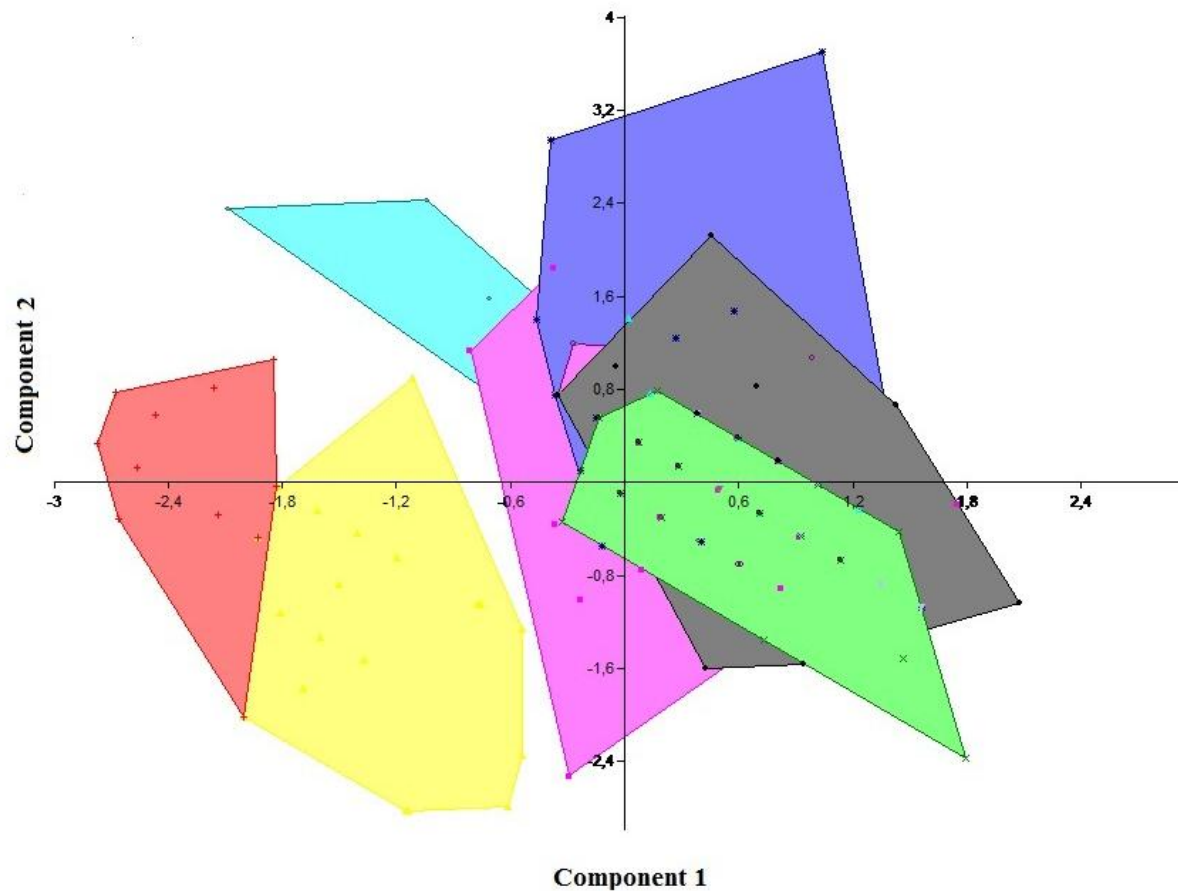
# Figuras



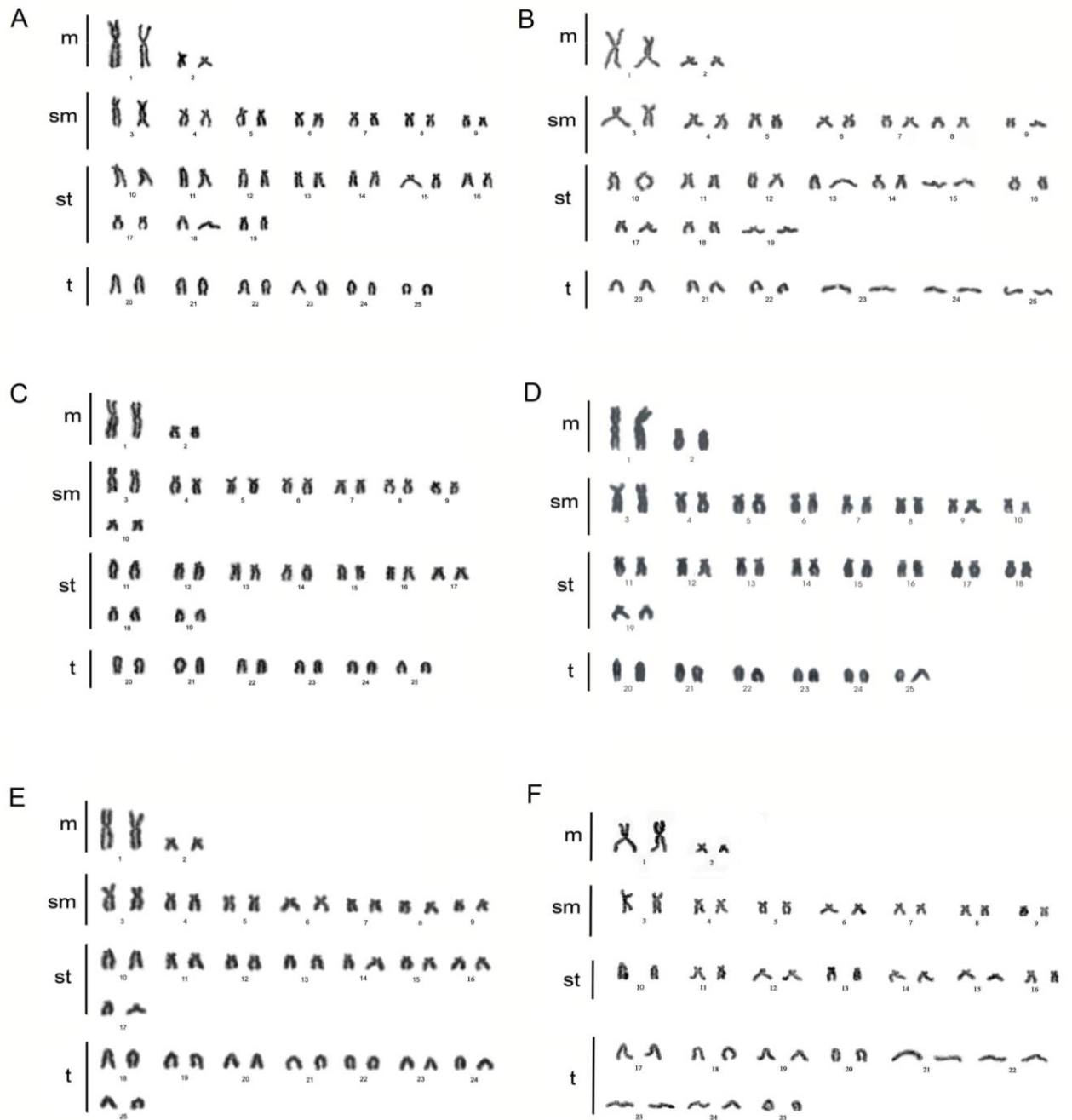
**Figura 1.** Locais de coletas nas bacias hidrográficas do rio Doce e São Francisco no sudeste do Brasil.



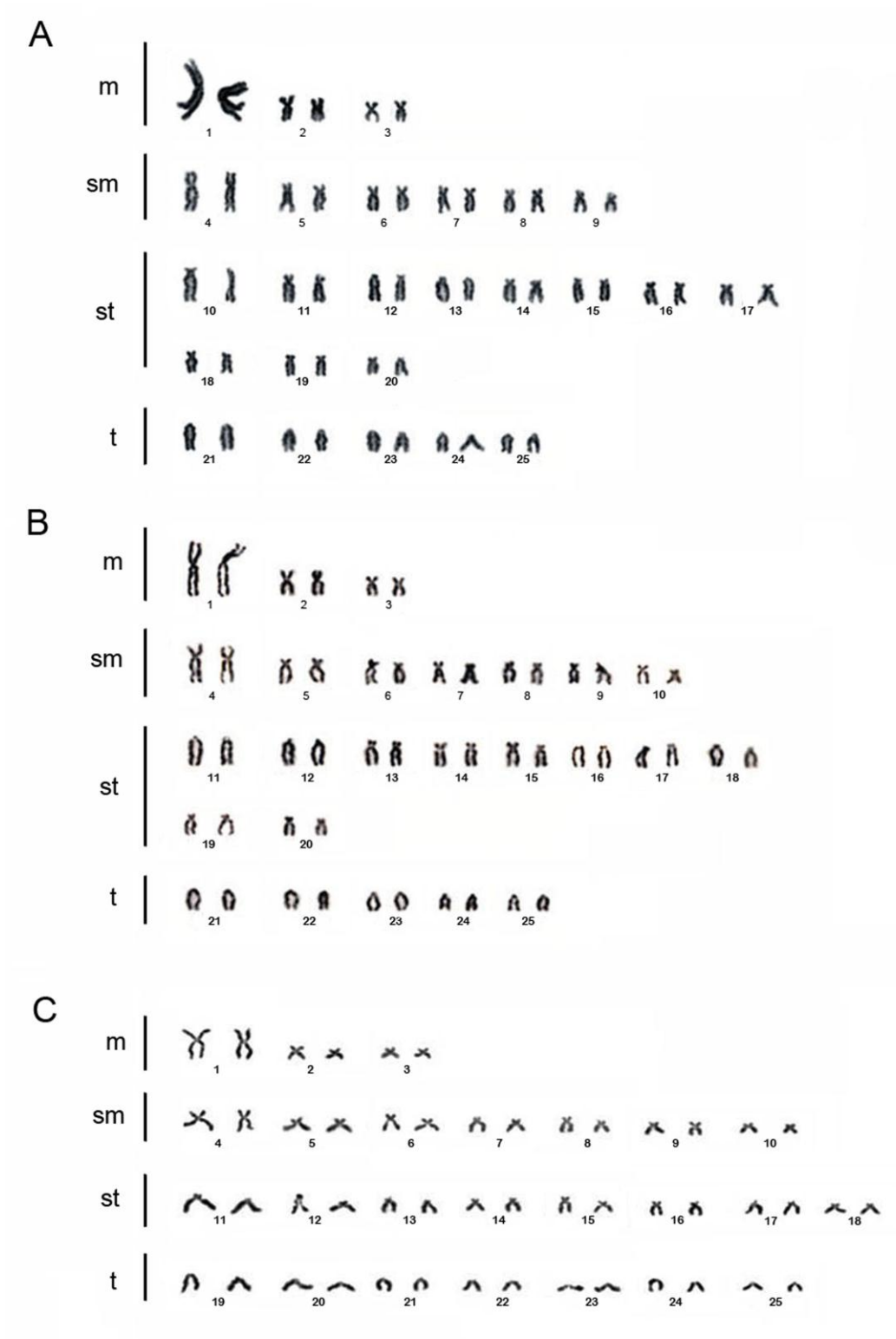
**Figura 2.** Projeção dos escores individuais resultantes da Análise de Componentes Principais (PCA) para 18 caracteres merísticos e morfométricos em populações de *Oligosarcus*. Em vermelho espécimes de *O. argenteus* do município de Ouro Preto (alto São Francisco), em amarelo espécimes de *O. argenteus* do município de Viçosa (alto rio Doce) e as demais cores representam os espécimes de *O. solitarius* das lagoas do médio rio Doce - MG.



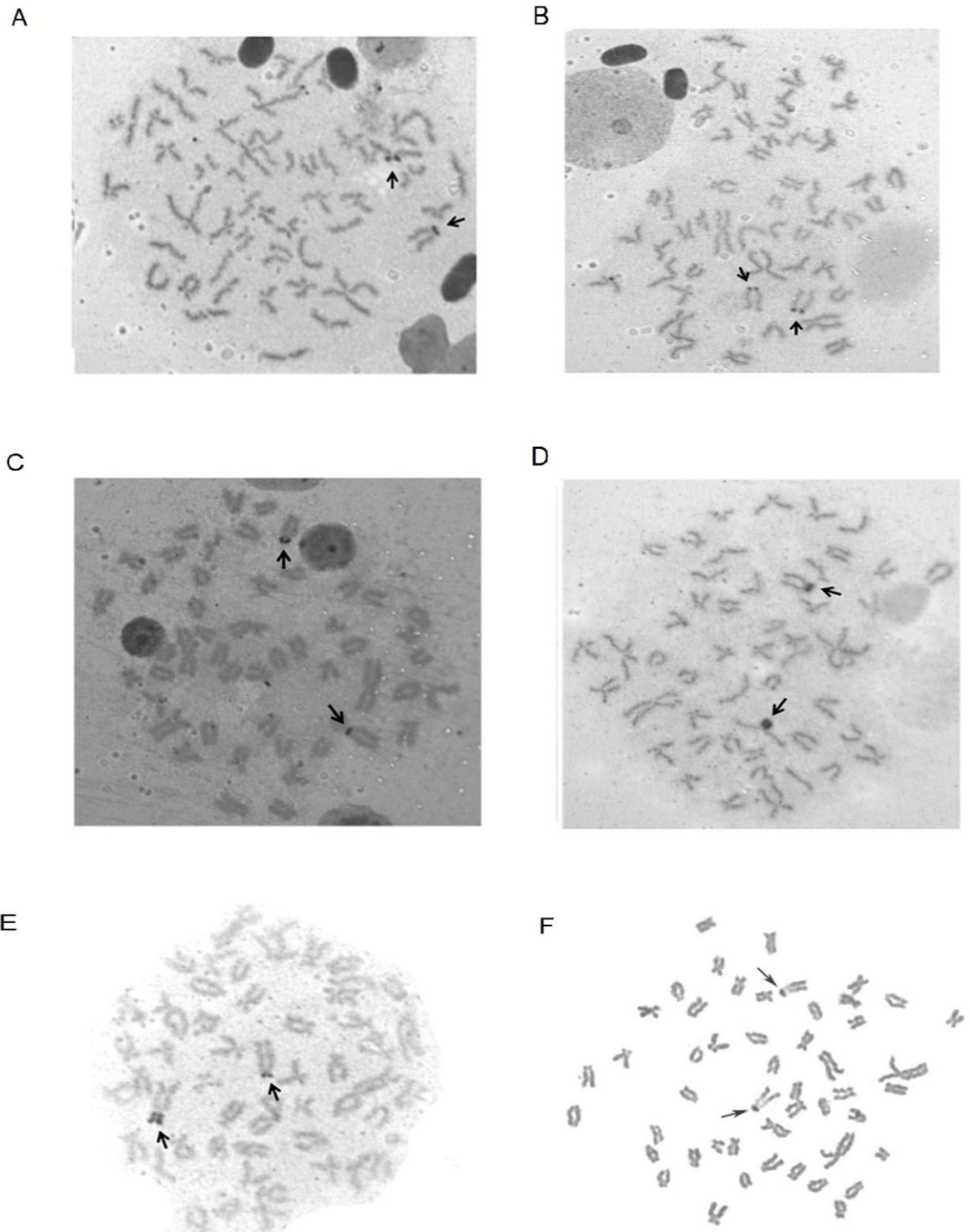
**Figura 3.** Projeção dos escores individuais resultantes da Análise de Componentes Principais (PCA) para quatro caracteres merísticos e morfométricos considerados diagnósticos para as espécies *O. solitarius* e *O. argenteus* segundo Menezes (1987). Em vermelho espécimes de *O. argenteus* do município de Ouro preto (rio Das Velhas), em amarelo espécimes de *O. argenteus* do município de Viçosa (alto rio Doce) e as demais cores representam os espécimes de *O. solitarius* das lagoas do médio rio Doce - MG.



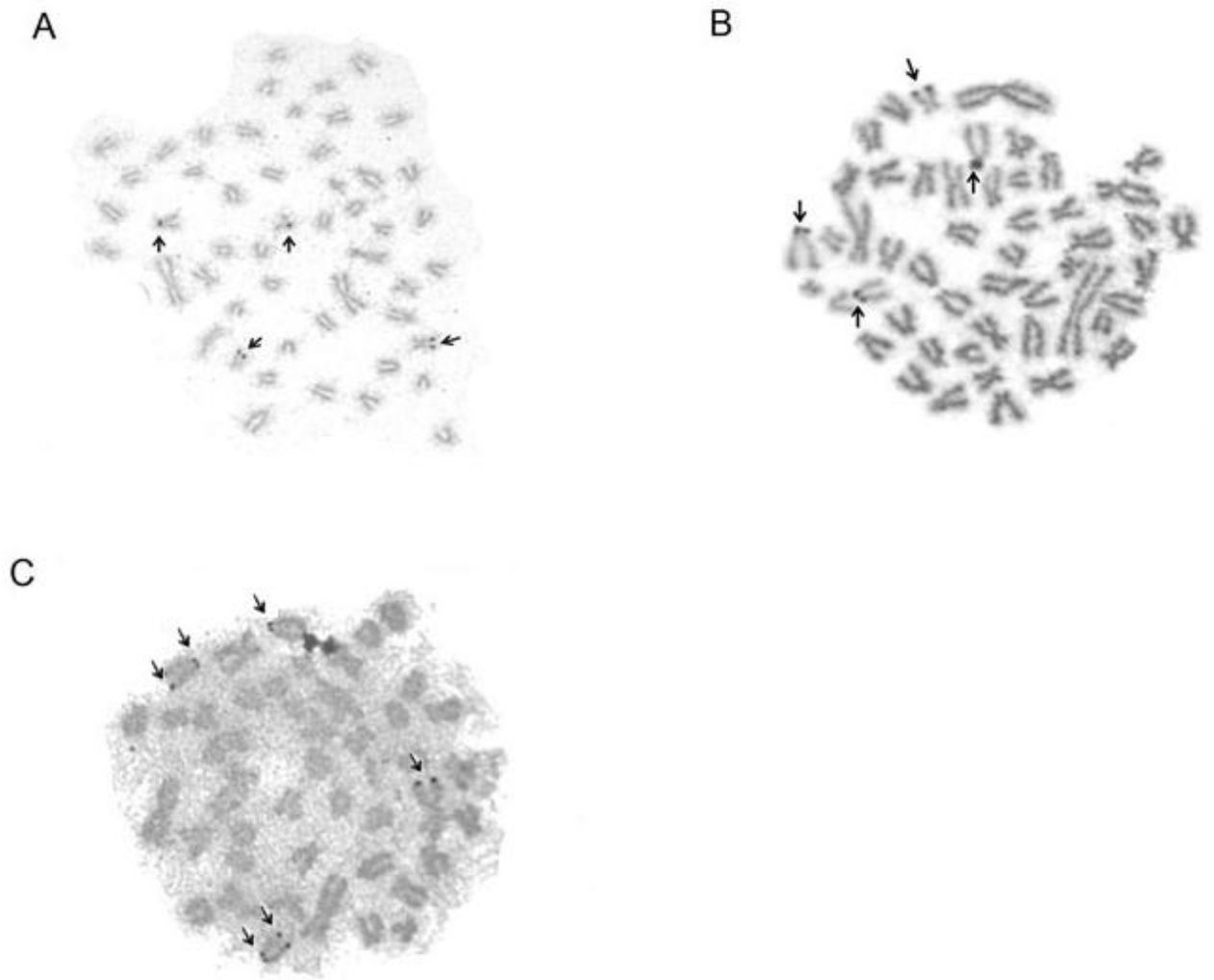
**Figura 4.** Cariótipos das populações de *O. solitarius* pertencentes às lagoas do médio rio Doce - MG. Lagoa Cure (A), Lagoa Juiz de Fora (B), Lagoa Hortência (C), Lagoa Tiririca (D), Lagoa Linguíça (E) e Lagoa Alméciga (F). Cromossomos tratados com giemsa 5%. Bar= 5μ.



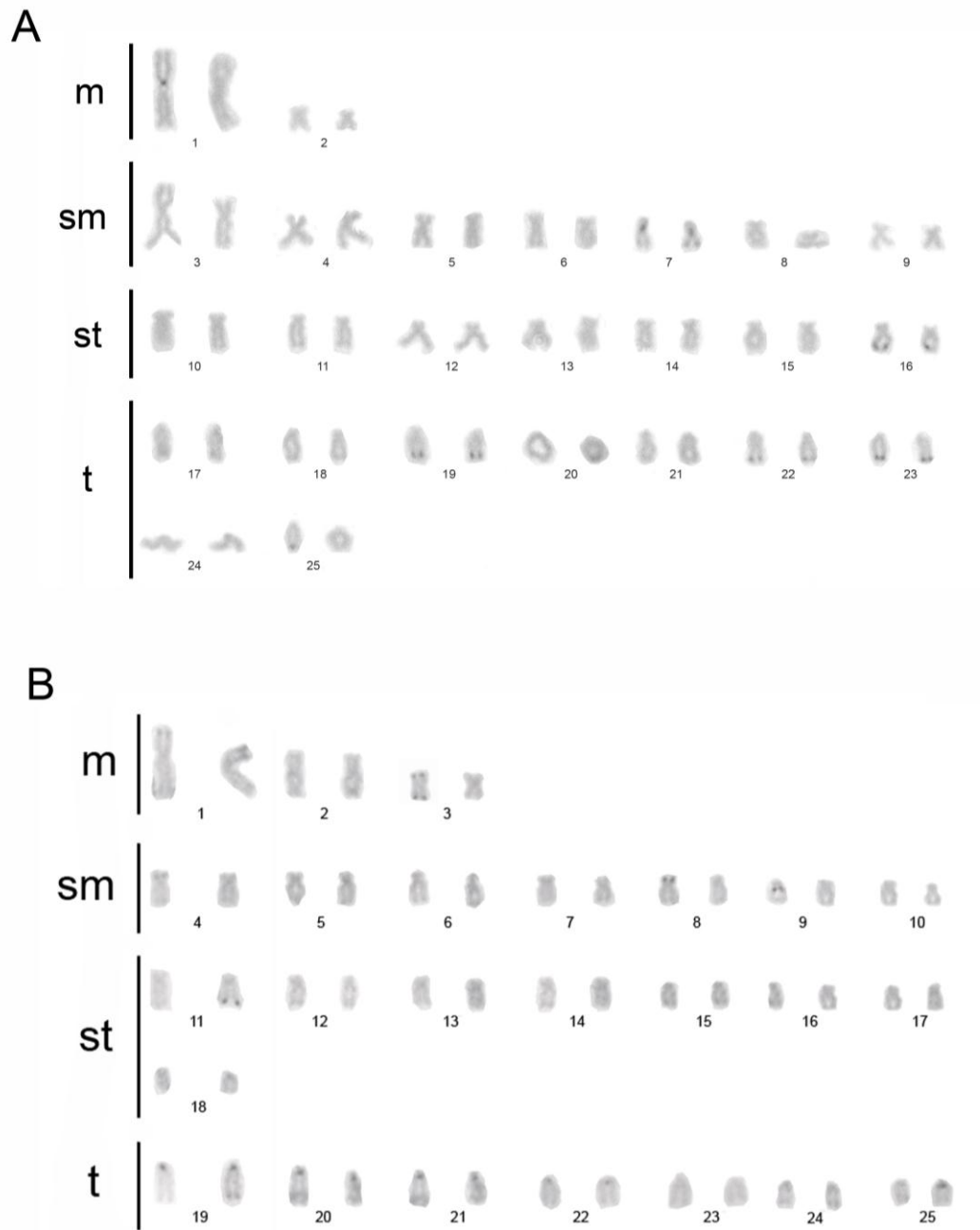
**Figura 5.** Cariótipos das populações de *Oligosarcus argenteus* das bacias do alto rio Doce e São Francisco-MG. Rio Casca (A), Viçosa (B) e Ouro Preto (C). Cromossomos tratados com giemsa 5%. Bar= 5 $\mu$ .



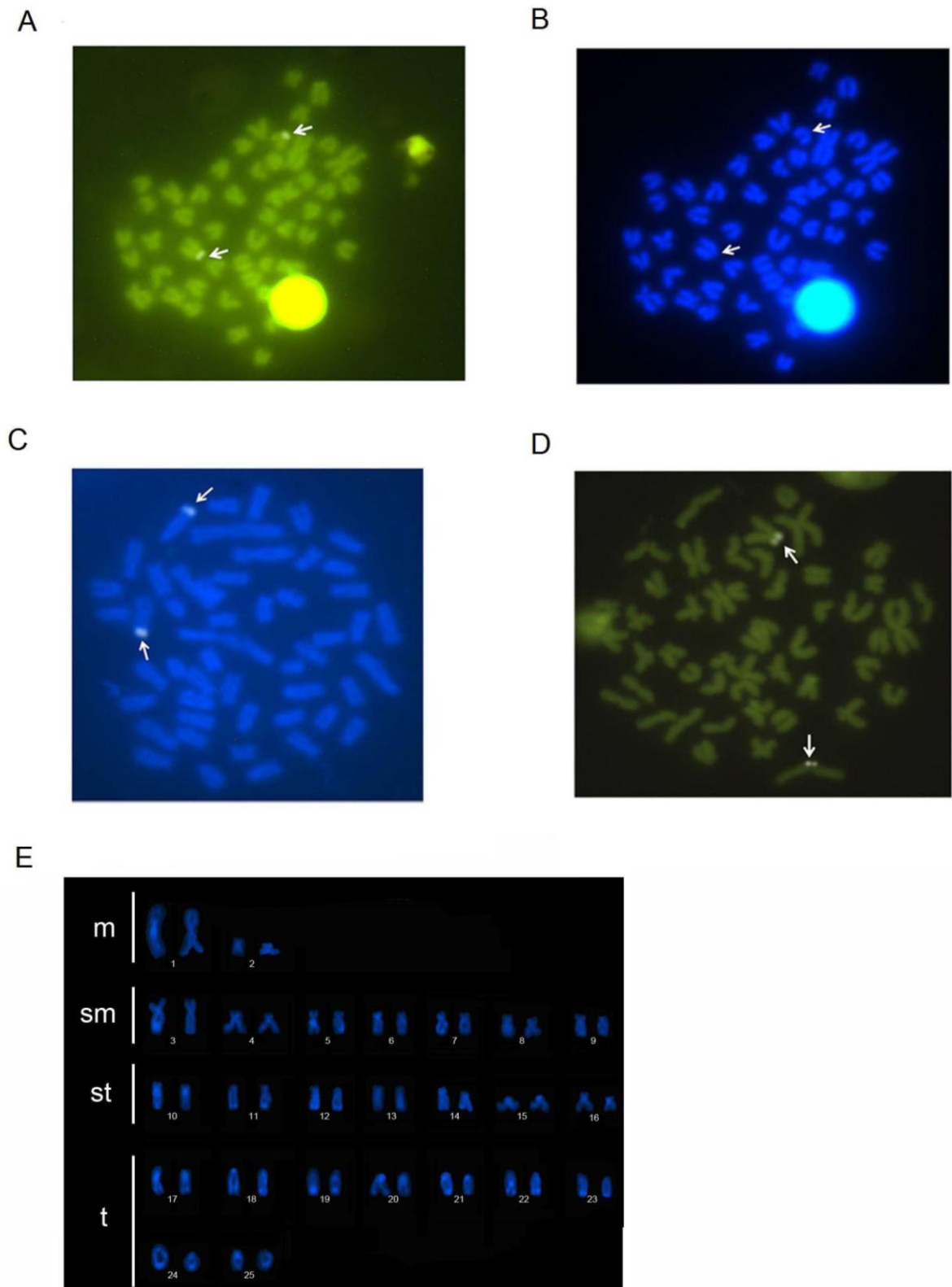
**Figura 6.** Ag-NORs das populações de *Oligosarcus solitarius* pertencentes às lagoas do médio rio Doce - MG. Lagoa Cure (A), Lagoa Juiz de Fora (B), Lagoa Hortência (C), Lagoa Tiririca (D), Lagoa Linguíça (E) e Lagoa Alméciga (F). Cromossomos tratados com Nitrato de prata. Bar= 5 $\mu$ .



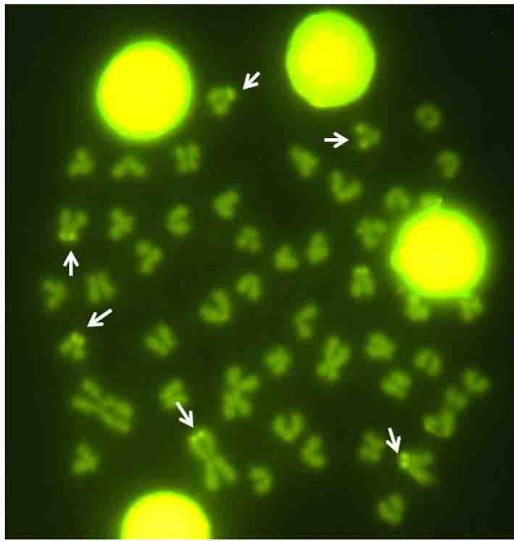
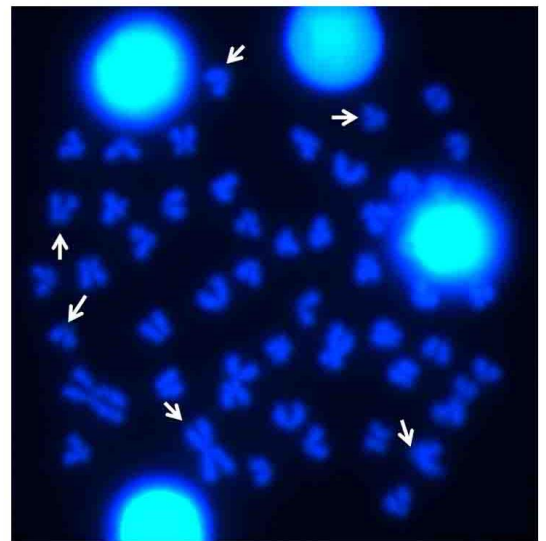
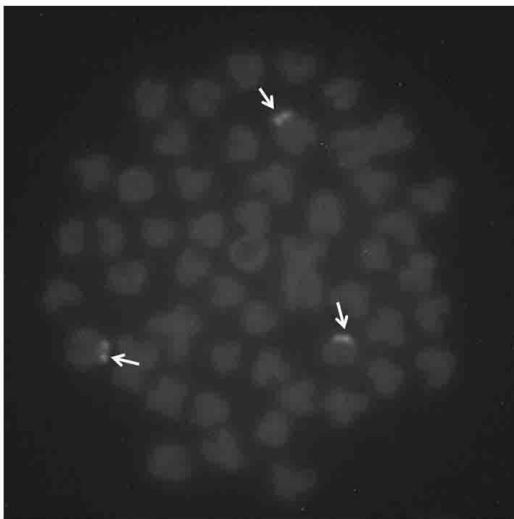
**Figura 7.** Ag-NORs das populações de *Oligosarcus argenteus* das bacias do alto rio Doce e São Francisco. Rio Casca (A), Viçosa (B) e Ouro Preto (C). Cromossomos tratados com Nitrato de prata. Bar= 5 $\mu$ .



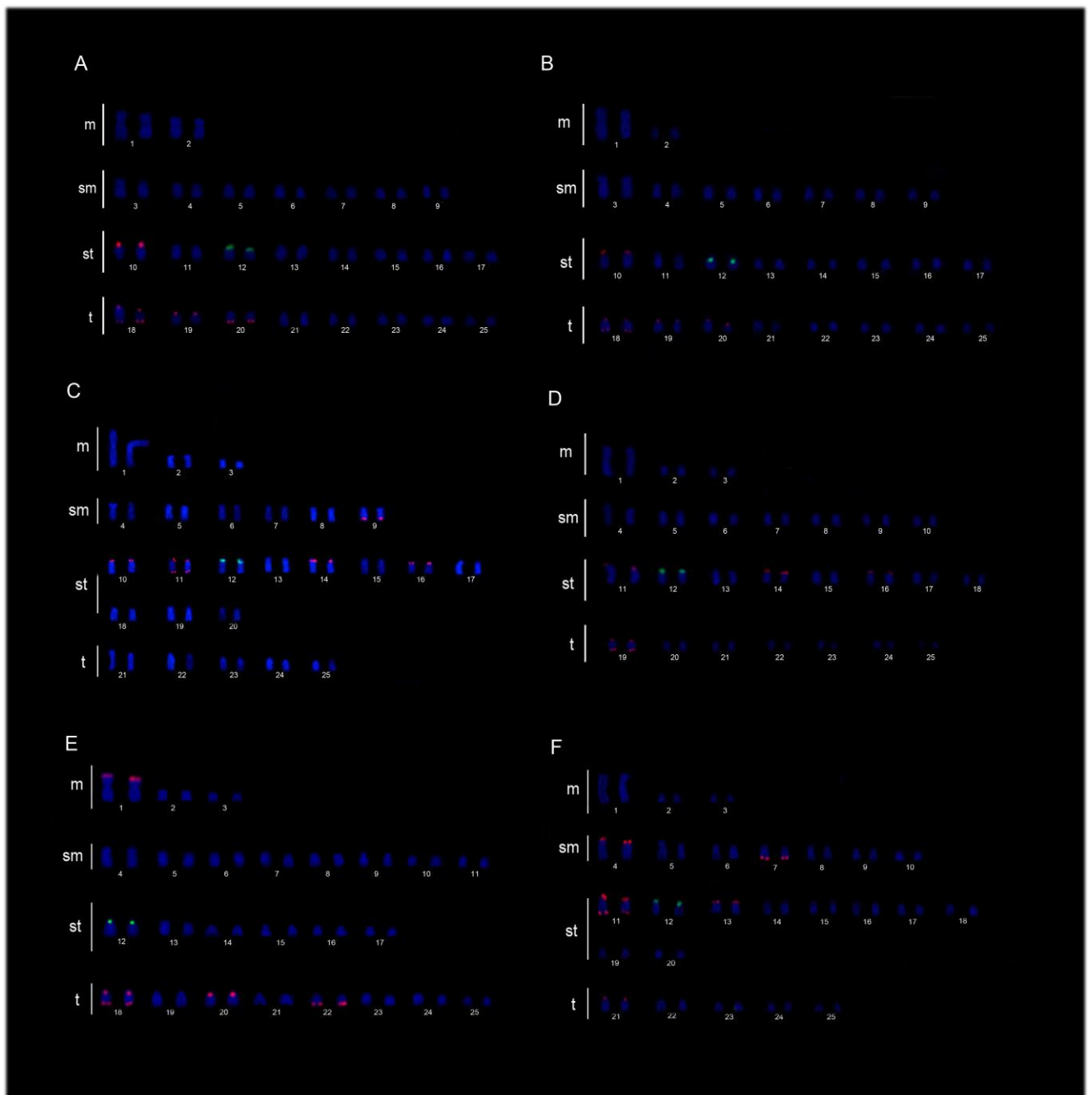
**Figura 8.** Técnica de bandamento C da população de *O. solitarius* do médio rio Doce, lagoa Alméciga (A) e da população de *O. argenteus* do alto rio Doce, Viçosa (B). Barra 5μ.



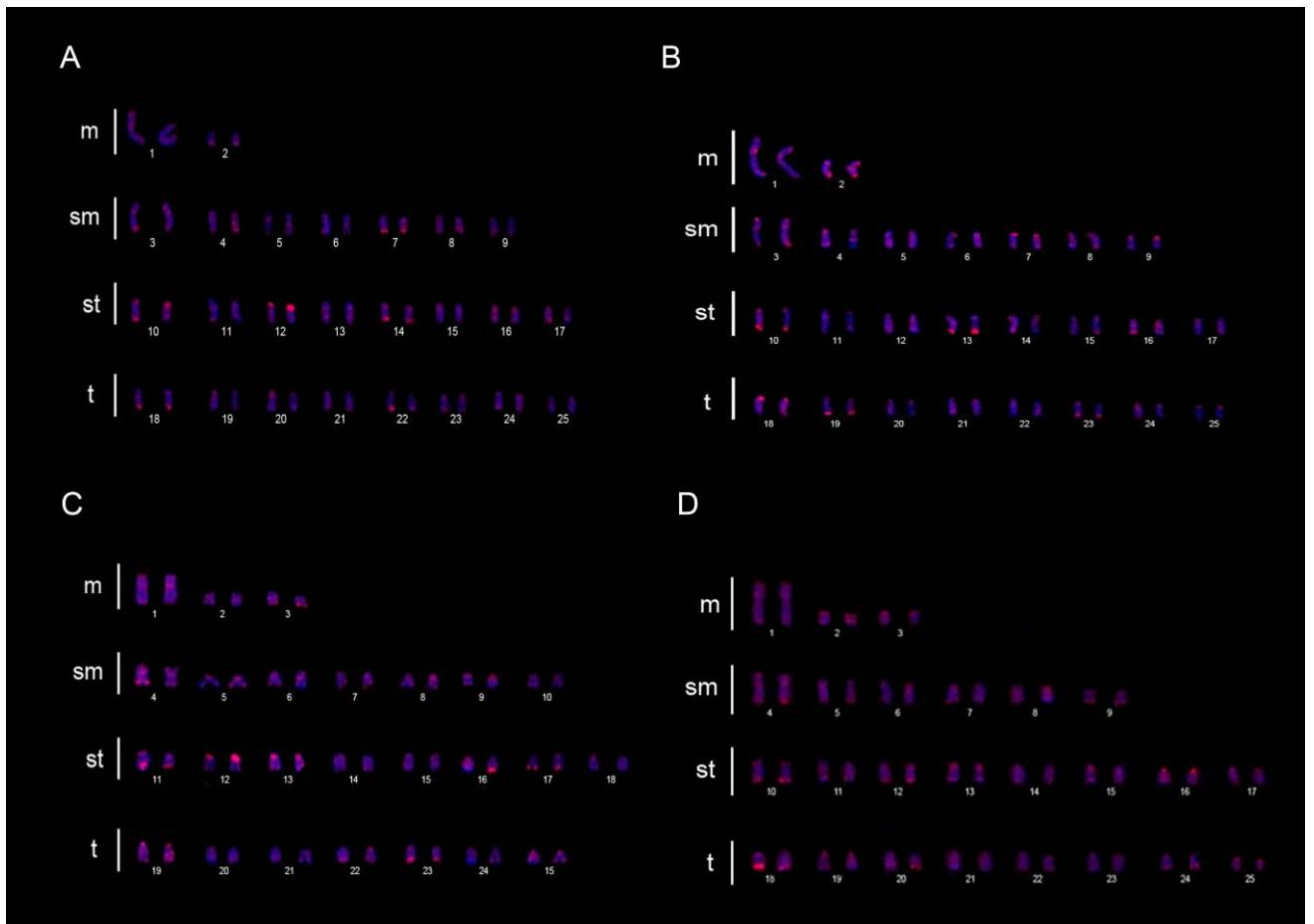
**Figura 9.** Preparação cromossômica das populações de *Oligosarcus solitarius* pertencentes às lagoas do médio rio Doce - MG. Lagoa Hortêncica (A) CMA<sub>3</sub> e (B) DAPI, Lagoa Tiririca (C) DAPI, Lagoa Linguíça (D) CMA<sub>3</sub> e Lagoa Almêcega (E) bandamento C / DAPI. Bar= 5 $\mu$ .

**A****B****C**

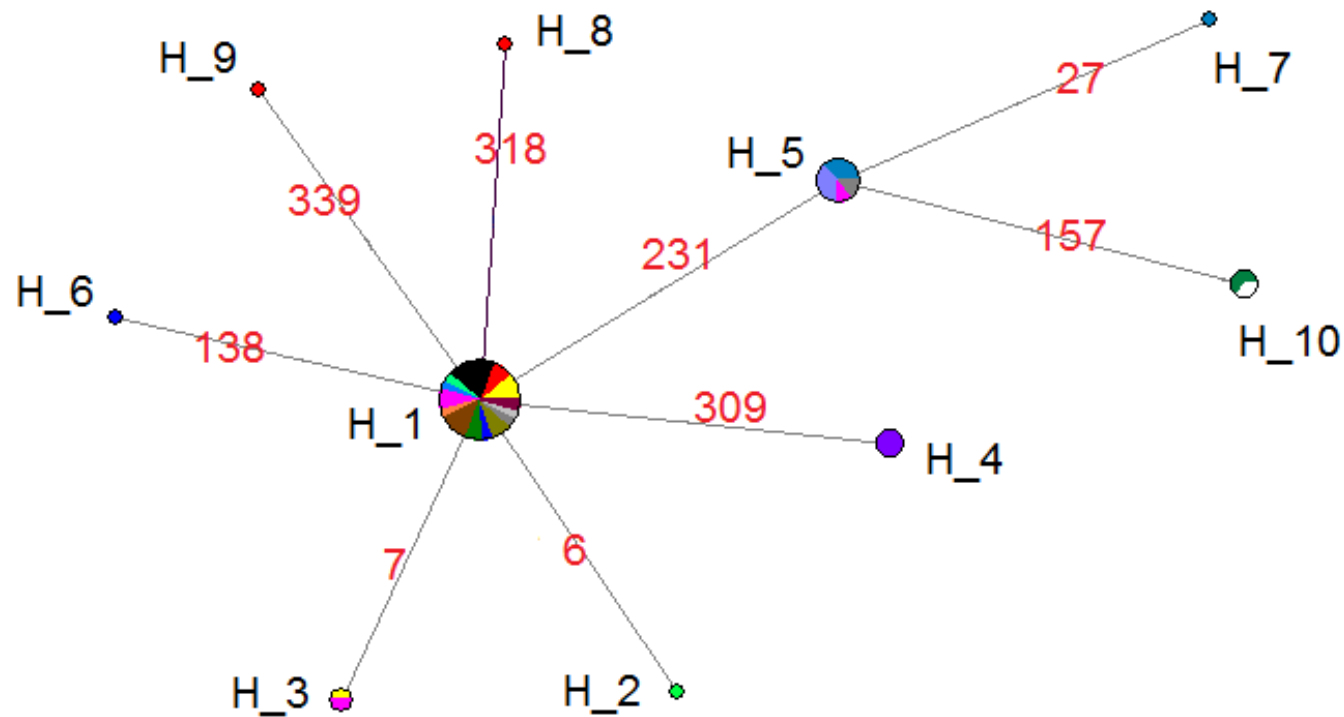
**Figura 10.** Preparação cromossômica das populações de *Oligosarcus argenteus* das bacias do alto rio Doce e São Francisco-MG. Rio Casca (A) técnica CMA<sub>3</sub>, (B) DAPI e Viçosa (C) técnica CMA<sub>3</sub>. Bar= 5 $\mu$ .



**Figura 11.** Hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) das populações de *Oligosarcus solitarius* do médio rio Doce, lagoa Aguapé (A), lagoa Linguça (B). Populações de *Oligosarcus argenteus* do alto rio Doce, Ponte Nova (C), Viçosa (D), Coimbra (E), e populações de *Oligosarcus argenteus* pertencente ao rio Das Velhas, Ouro Preto (F). Bar=5 $\mu$ .



**Figura 12.** Hibridização *in situ* para a sonda de microsatélites (CA)<sub>15</sub>. Populações de *Oligosarcus solitarius* do médio rio Doce, lagoa Agupé (A), lagoa Linguíça (B). População de *Oligosarcus argenteus* do alto rio Doce, Viçosa (C) e população de *Oligosarcus argenteus* pertencente ao rio Das Velhas, Ouro Preto (D). Bar=5 $\mu$ .



**Figura 13.** Rede de aplótipos construída através dos pares de bases do fragmento citocromo b para as populações de *Oligosarcus* das bacias do Rio Doce e São Francisco - MG. H\_ corresponde ao aplótipo e os números em vermelho à localização da substituição na sequência. H\_1: lagoa Cure, lagoa Hortência, lagoa Cristal, lagoa Juiz de Fora, lagoa Timburé, lagoa Romoalda, lagoa Silvana, Ponte Nova, Viçosa, Ouro Preto, rio Casca, rio Matipó e rio Piracicaba, H\_2: lagoa Hortência, H\_3: lagoa Cristal e Coimbra, H\_4 :lagoa Linguíça, H\_5: lagoa Ferrugem, lagoa Tiririca, Ponte Nova e lagoa Timburé, H\_6: rio Matipó, H\_7: lagoa Ferrugem, H\_8: rio Casca, H\_9: rio Casca, 10\_: rio das Pacas e rio Piracicaba.

---

# Tabelas

**Tabela I.** Locais de coleta, número de espécimes utilizados para morfometria, citogenética, molecular, fórmula cromossômica e coordenadas geográficas

Localidades	Região	Morfometria	Citogenética	Molecular	Fórmula Cariotípica				Localização geográfica (GPS)		
		n	n		n	m	sm	st			t
L.Cure	M. Doce	-	2 ♀ - 1 ♂	3	4	4	14	20	12	19°43'00,50''S	42°27'57,46''W
L. Juiz de Fora	M. Doce	21	3 ♀ - 1 ♂	4	1	4	14	20	12	19°41'57,43''S	42°28'56,71''W
L. Hortência	M. Doce	4	3 ♀ - 3 ♂	6	2	4	16	18	12	19°42'27,64''S	42°28'16,43''W
L.Tiririca	M. Doce	20	5 ♀ - 7 ♂	12	3	4	16	18	12	19°44'56,49''S	42°27'03,67''W
L. Linguíça	M. Doce	20	4 ♀ - 6 ♂	10	3	4	14	16	16	19°33'16,97''S	42°29'44,49''W
L. Alméciga	M. Doce	-	2 ♀ - 2 ♂	4	-	4	14	14	18	19°50'59,95''S	42°37'38,37''W
L. Aguapé	M. Doce	12	2 ♀ - 4 ♂	6	-	-	-	-	-	19°50'44,27''S	42°38'45,58''W
L. Palmeiras	M. Doce	18	2 ♀ - 2 ♂	4	-	-	-	-	-	19°52'30,31''S	42°36'18,27''W
L. Malba	M. Doce	6	-	-	-	-	-	-	-	19°51'08,52''S	42°33'40,68''W
L. Cristal	M. Doce	20	-	-	4	-	-	-	-	19°34'20,60''S	42°27'46,33''W
L. Ferrugem	M. Doce	18	-	-	4	-	-	-	-	19°52'41,04''S	42°36'34,95''W
L.Silvana	M. Doce	-	-	-	2	-	-	-	-	19°29'19,35''S	42°25'30,58''W
L. Marola	M. Doce	-	-	-	1	-	-	-	-	19°17'18,29''S	42°23'59,57''W
L. Timburé	M. Doce	-	-	-	2	-	-	-	-	19°49'49,64''S	42°37'17,43''W
L. Romoalda	M. Doce	-	-	-	1	-	-	-	-	19°30'44,61''S	42°36'53,52''W
R. Piracicaba	M. Doce	-	-	-	4	-	-	-	-	19°30'44,61''S	42°32'91,54''W
R. das Pacas	Alto Doce	-	-	-	1	-	-	-	-	19°57'54,50''S	43°25'13,11''W
Rio Casca	Alto Doce	-	6 ♀ - 3 ♂	9	6	6	12	22	10	20°13'32,01''S	42°39'02,10''W
Ponte Nova	Alto Doce	-	-	-	-	-	-	-	-	20°24'45,48''S	42°53'57,40''W
Coimbra	Alto Doce	-	-	-	1	-	-	-	-	20°51'32,78''S	42°47'51,63''W
Viçosa	Alto Doce	20	9 ♀ - 8 ♂	17	3	6	14	16	14	20°46'17,22''S	42°52'28,47''W
Ouro Preto	São Francisco	-	7 ♀ - 8 ♂	15	3	6	14	20	10	20°18'50,11''S	43°34'43,37''W
<b>Total</b>		<b>159</b>		<b>90</b>	<b>45</b>						

**Tabela II.** Caracteres considerados diagnósticos das espécies *O. solitarius* e *O. argenteus* (Menezes, 1987)

CARACTERISTICA	<i>O. solitarius</i>	<i>O. argenteus</i>
Nadadeira anal	iv-v, 23-28	iv-v, 20-25
Escamas perfuradas pela linha lateral	48-55	44-48
Séries horizontais de escamas acima da linha lateral	8-10	8-9
Séries horizontais de escamas abaixo da linha lateral	7-8	6-8
Dentes no maxilar	24-35	17-24
Dentes na parte posterior do dentário	13-23	10-19
Dentes no ectopterigóide	10-21	8-15
Posição mandíbula-focinho	posterior	junto
Visibilidade dos dentes do pré-maxilar com boca fechada	visíveis	não visíveis
Dentes no Pré- maxilar		
*Comprimento padrão		
*Altura do corpo		
*Comprimento da cabeça		
*Cabeça sem o opérculo		
*Comprimento do pré-maxilar		
*Altura do Pedúnculo caudal		
*Distância interorbital		
*Nadadeira dorsal		

(\*) caracteres incluídos no trabalho

**Tabela III.** Dados moleculares de populações de *Oligosarcus* nas bacias dos rios Doce e São Francisco - MG

<b>Espécie</b>	<b>Localidades</b>	<b>Bacia Hidrográfica</b>	<b>Molecular</b>	<b>Haplótipos</b>
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Cure	Rio Doce	4	Hap_ 1:4
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Juiz de Fora	Rio Doce	1	Hap_ 1:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Hortência	Rio Doce	2	Hap_ 1:1 Hap_ 2:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Tiririca	Rio Doce	3	Hap_ 5:3
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Linguíça	Rio Doce	3	Hap_ 4:3
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Cristal	Rio Doce	4	Hap_ 1:3 Hap_ 3:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Ferrugem	Rio Doce	4	Hap_ 5:3 Hap_ 7:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Silvana	Rio Doce	2	Hap_ 1:2
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Marola	Rio Doce	1	Hap_ 1:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Timburé	Rio Doce	2	Hap_ 1:1 Hap_ 5:1
<i>O. solitarius</i>	Lagoa Romoalda	Rio Doce		Hap_ 1:1
<i>O. solitarius</i>	Rio Piracicaba	Rio Doce	4	Hap_ 1:2
<i>O. solitarius</i>	Rio das Pacas	Rio Doce	1	Hap_ 10:1
<i>O. argenteus</i>	Rio Matipó	Rio Doce	1	Hap_ 7:1
<i>O. argenteus</i>	Rio Casca	Rio Doce	5	Hap_ 1:3 Hap_ 8:1 Hap_ 9:1
<i>O. argenteus</i>	Ponte Nova	Rio Doce	3	Hap_ 1:2 Hap_ 5:1
<i>O. argenteus</i>	Coimbra	Rio Doce		Hap_ 3:1
<i>O. argenteus</i>	Viçosa	Rio Doce	3	Hap_ 1:2
<i>O. argenteus</i>	Ouro Preto	São Francisco	3	Hap_ 1:3

(Hap\_ 1:1 = Hapótipo e número de espécimes correspondente)

**Tabela IV.** Estimativa média do fluxo gênico entre as populações de *Oligosarcus* das bacias do Rio Doce e São Francisco - MG

	L. Cure	L. Hortência	L. Cristal	L. Linguiça	L. Tiririca	Ponte Nova	Coimbra	Viçosa	Ouro Preto	Rio Casca	R. Piracicaba
L. Cure											
L. Hortência	0.000										
L. Cristal	0.000	s/n									
L. Linguiça	1.000	0.667	0.750								
L. Tiririca	1.000	0.667	0.750	1.000							
Ponte Nova	0.000	0.000	0.000	0.750	0.500						
Coimbra	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000					
Viçosa	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000				
Ouro Preto	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000			
Rio Casca	0.000	0.000	0.000	0.667	0.667	0.000	0.000	0.000	0.000		
R. Piracicaba	0.500	0.353	0.391	0.727	0.400	0.176	0.176	0.500	0.500	0.353	
Silvana	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

**Tabela V.** Dados cariotípicos das espécies de *Oligosarcus*

Espécie	Localidade	2n	Cariótipos				Ag-NOR	Referência
			m	sm	st	t		
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Rio Juquiá e Ipiranga (SP)	50	2	26	4	18	1-4	Falcão, 1983; Falcão & Bertollo, 1985
<i>Oligosarcus jenynsii</i>	Ipiranga (SP)	50	6	22	6	16	2	Falcão, 1983; Falcão & Bertollo, 1985
<i>Oligosarcus macrolepis</i>	Rio Turvo (MG)	50	8	20	6	16	-	Falcão, 1983; Falcão & Bertollo, 1985
<i>Oligosarcus pintoii</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	50	4	20	10	16	1-2	Falcão, 1983; Falcão & Bertollo, 1985
<i>Oligosarcus longirostris</i>	Rio Iguaçu e Três Barras (PR)	50	2	20	10	18	5	Martinez et al., 2004
<i>Oligosarcus cf. paranensis</i>	Rio Keller (PR)	50	2	26	8	14	4	Martinez et al., 2004
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Rio Paraitinga e Jacuí, Paraíba do Sul	50	6	10	16	18	2	Kavalco et al., 2005
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Ribeirão Grande, Paraíba do Sul	50	6	12	14	18	3	Centofante et al., 2006
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Rio Santo Antônio, Paraíba do Sul	50	4	12	16	18	3	Centofante et al., 2006
<i>Oligosarcus longirostris</i>	Quedas do Iguaçu (PR)	50	4	10	16	20	2	Rubert & Margarido, 2007
<i>Oligosarcus pintoii</i>	Rio turvo, bacia rio Piquiri (PR)	50	4	10	16	20	4	Rubert & Margarido, 2007
<i>Oligosarcus paranensis</i>	Rio turvo, bacia rio Piquiri (PR)	50	4	10	16	20	4	Rubert & Margarido, 2007

---

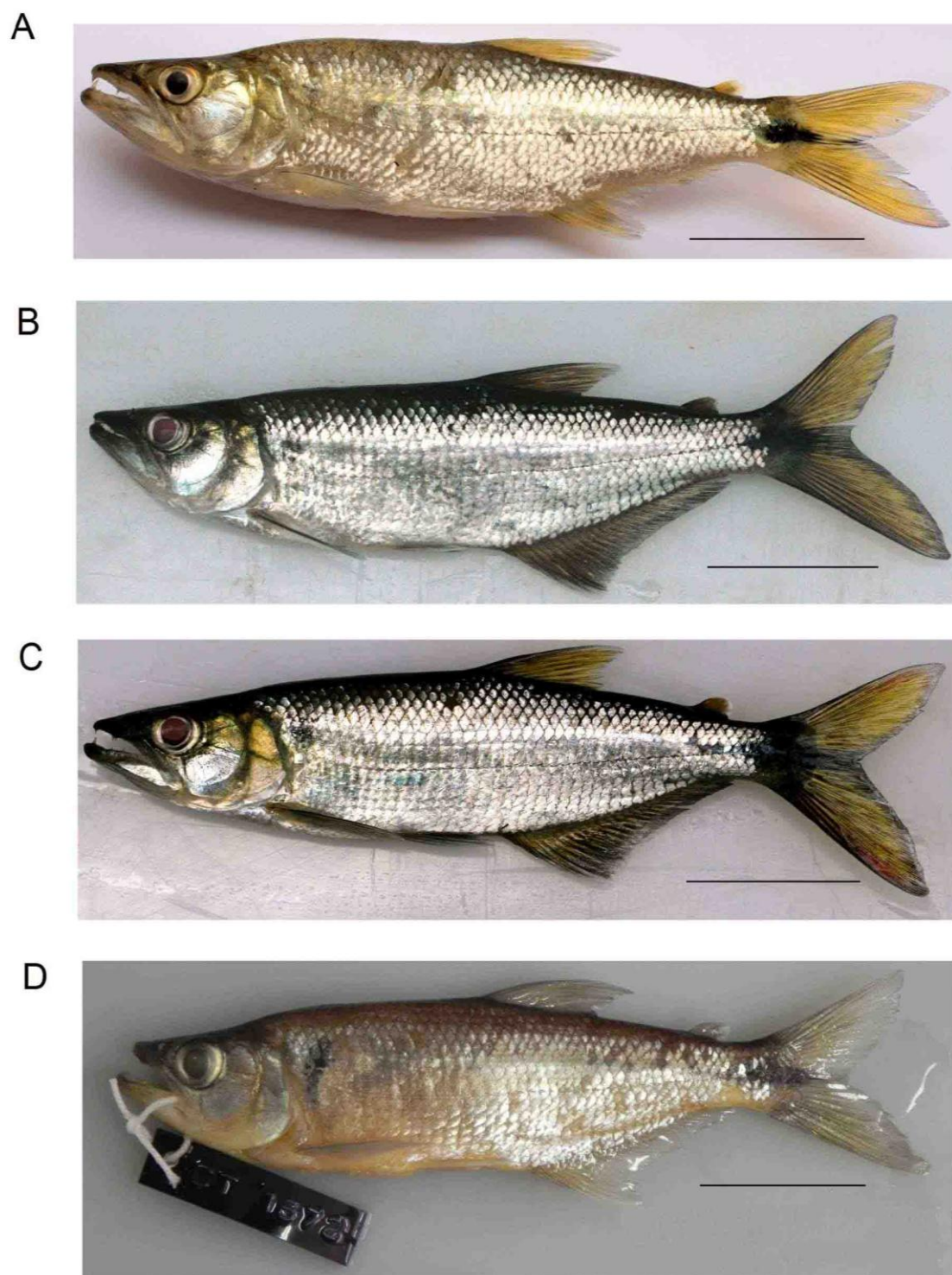
# Anexos



**Anexo I.** Localização geográfica dos pontos de coleta nas lagoas do médio rio Doce - MG. Setas em vermelho apontam: lagoa Carioca localidade tipo de *Oligosarcus solitarius* (A) e calha do rio Doce (B). Setas amarelas apontam local onde foram coletados os espécimes de *O. solitarius*.



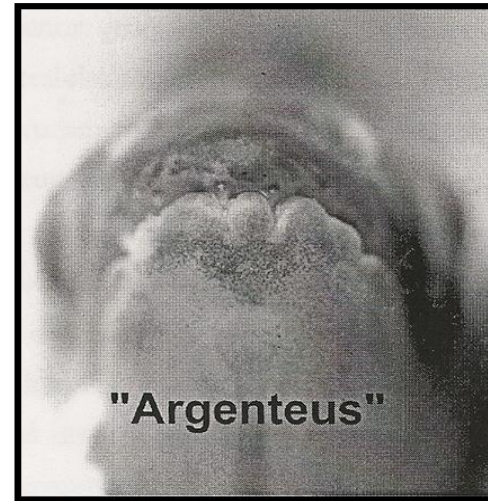
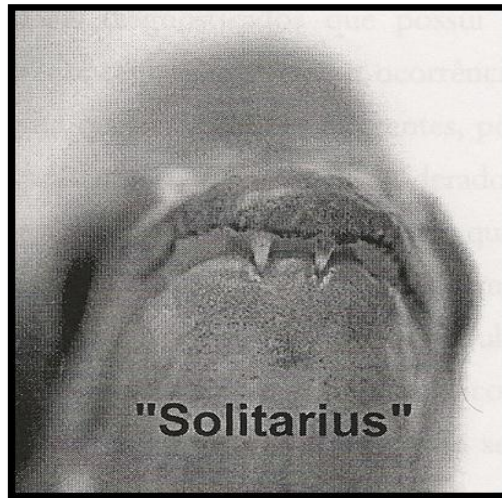
**Anexo II.** Localização geográfica da lagoa Linguica.



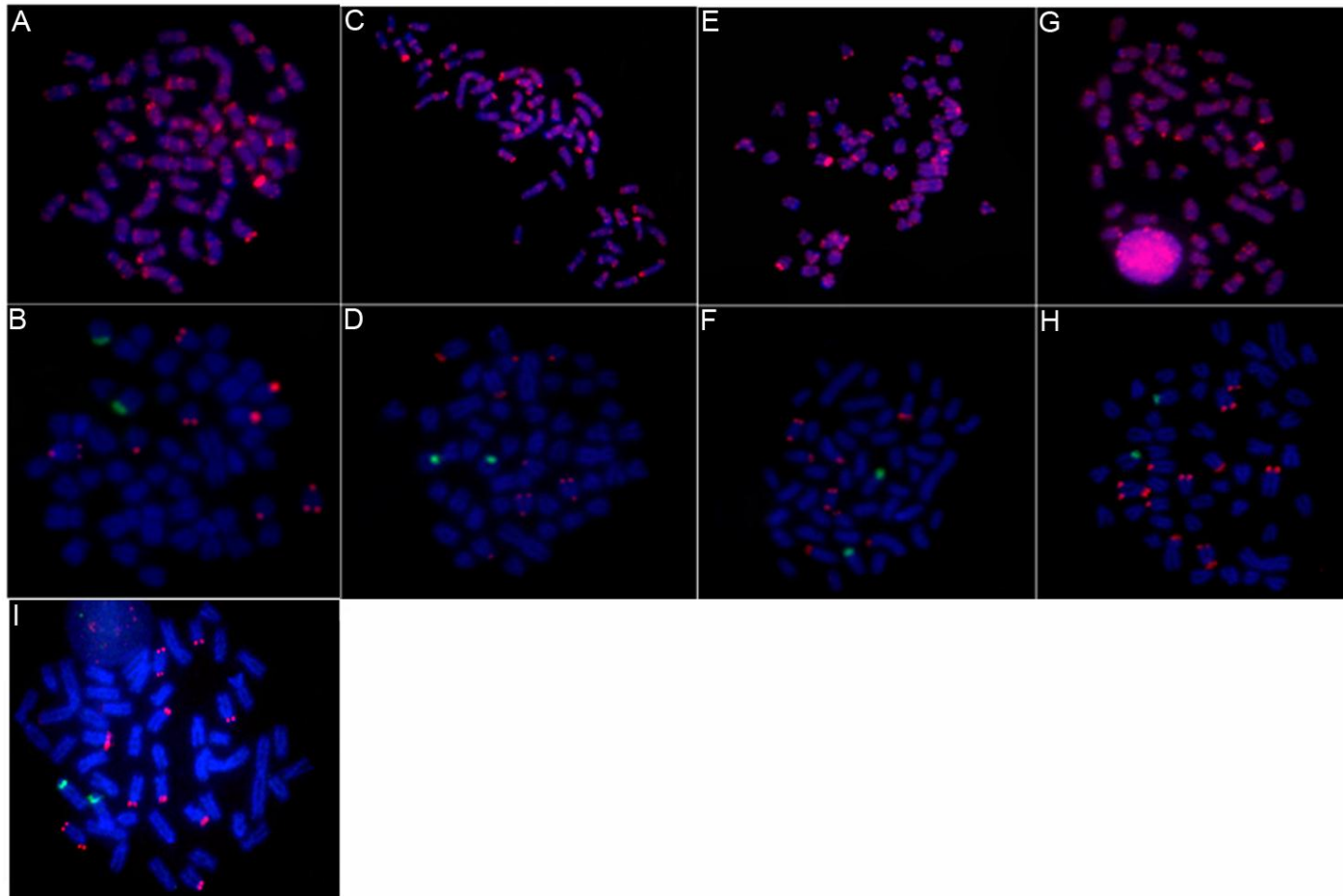
**Anexo III.** Exemplos de *Oligosarcus solitarius* pertencentes às lagoas do médio rio Doce- MG. Lagoa Hortência (A), Lagoa Tiririca (B), Lagoa Linguíça (C) e Lagoa Almécega (D). Barra 5cm.



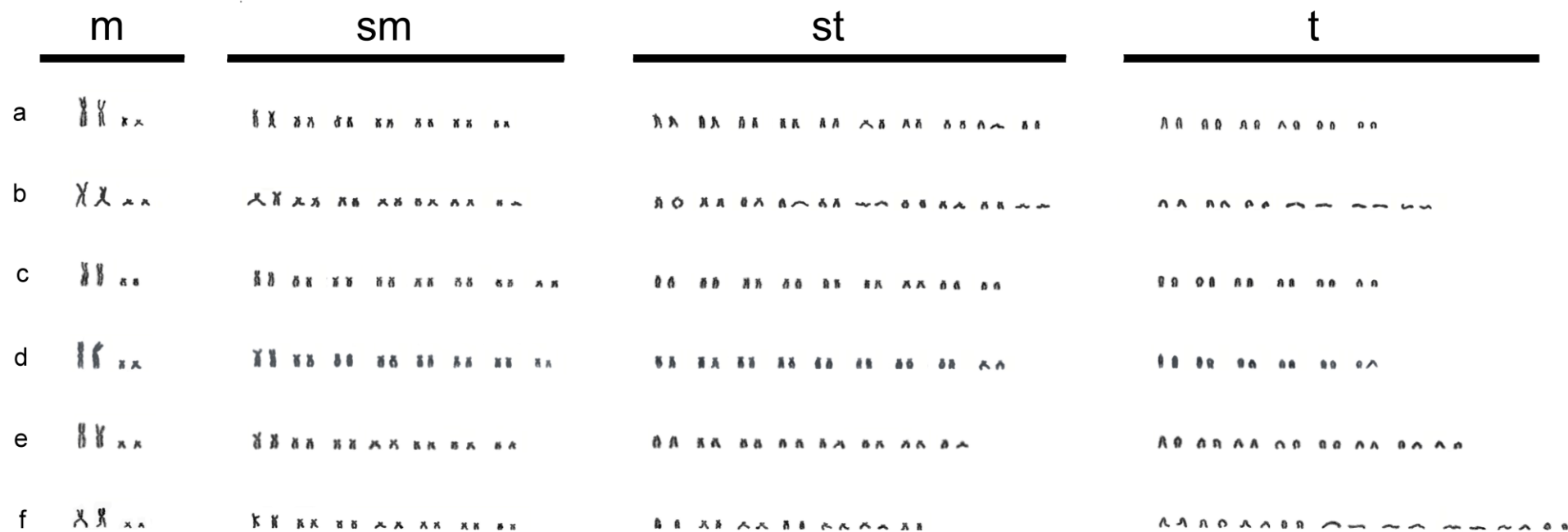
**Anexo IV.** Exemplos de *Oligosarcus argenteus* das bacias do alto rio Doce e São Francisco-MG. Viçosa (A), Coimbra (B) e Ouro Preto (C) e (D). Barra 5cm



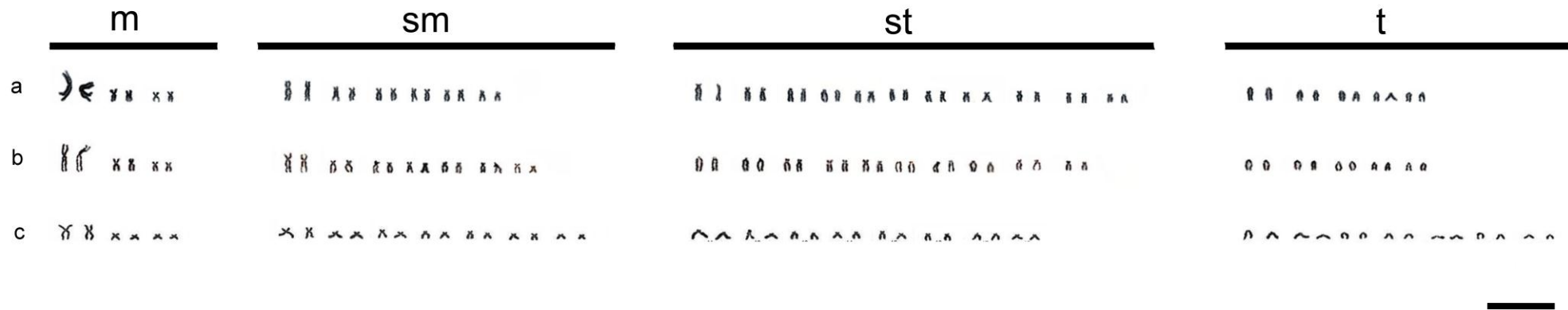
**Anexo V.** Visibilidade dos dentes caniniformes em relação à mandíbula e maxila superior. Caractere diagnóstico segundo Menezes (1987).



**Anexo VI.** Hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S e 5S e sonda de microssatélites (CA)<sub>15</sub> das populações de *O. solitarius* e *O. argenteus* pertencentes a bacia do rio Doce e rio Das Velhas bacia do rio São Francisco-MG. Lagoa Aguapé (a-b), lagoa Linguiça (c-d), Viçosa (e-f), Ouro Preto (g-h) e Coimbra (i). Bar=5 $\mu$ .



**Anexo VII.** Cariótipos das populações de *O. solitarius* pertencentes às lagoas do médio rio Doce - MG. Lagoa Cure (A), Lagoa Juiz de Fora (B), Lagoa Hortência (C), Lagoa Tiririca (D), Lagoa Linguíça (E) e Lagoa Almécega (F). Cromossomos tratados com giemsa 5%. Bar= 5 $\mu$ .



**Anexo VIII.** Cariótipos das populações de *Oligosarcus argenteus* das bacias do alto rio Doce e São Francisco-MG. Rio Casca (A), Viçosa (B) e Ouro Preto (C). Cromossomos tratados com giemsa 5%. Bar= 5 $\mu$ .