

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

MARCELA BAER PUCCI

DIVERSIFICAÇÃO E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW NO
GÊNERO *Characidium*

Ponta Grossa

2013

MARCELA BAER PUCCI

DIVERSIFICAÇÃO E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS ZZ/ZW
NO GÊNERO *Characidium*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho

Ponta Grossa

2013

- P977 Pucci, Marcela Baer
Diversificação e evolução dos cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero *Characidium* / Marcela Baer Pucci. Ponta Grossa, 2013.
82f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
- Orientador : Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho
1. Actinopterygii. 2. Citogenética. 3. Especiação. I. Vicari, Marcelo Ricardo. II. Moreira-Filho, Orlando. III.T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **MARCELA BAER PUCCI**.

Aos quinze dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Marcelo Ricardo Vicari, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **MARCELA BAER PUCCI**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Orientador UEPG), Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto (UNESPAR) Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Diversificação e Evolução dos Cromossomos Sexuais ZZ/ZW no Gênero *Characidium*"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 15 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari _____

Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto _____

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello _____

Dedico este trabalho aos meus pais
Marcos e Iris, aos meus amados irmãos
Ingrid e Giovanni e ao meu grande amor
Robson.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pela família maravilhosa que me deu de presente. Obrigada por proporcionar em meu lar, toda a força e apoio necessários para alcançar minhas conquistas até aqui. Obrigada também, por toda a proteção e apoio encontrados no Senhor.

Queria agradecer também àqueles que dedicam suas vidas, ao meu sucesso e dos meus irmãos. Pai e Mãe, obrigada por sempre confiarem em mim e por apoiarem todas as decisões em minha vida. Essa dissertação, assim como outras conquistas minhas, só foram possíveis graças a vocês, que sempre guiaram nossa família pelo caminho da honestidade e dignidade, sempre cobrando o empenho e dedicação em tudo. Tenho vocês como um exemplo de vida a ser seguido. Obrigada por tudo. Eu amo vocês. Agradeço aos melhores irmãos do Mundo, Ingrid e Giovanni, sempre pela amizade e companheirismo. Tenho muito orgulho de vocês dois.

Agradeço muito, ao grande amor da minha vida, “Xinaider”. Amor, você sabe que tenho muito respeito e admiração por você. Você além de namorado, é meu melhor amigo, confidente, companheiro pra tudo e pra todas as horas. Eu sei que posso contar com você a qualquer momento, mesmo nas maiores dificuldades. Por isto, também dedico este trabalho a você. Assim como nesta etapa de minha vida, você esteve comigo e me apoiou em todas as outras. Sempre com a maior paciência para ouvir todos os meus desabafos, assim como sempre teve as palavras mais reconfortantes, para estes e todos os momentos. Não vejo minha vida sem você. Obrigada por tudo mesmo. Te amo .

Gostaria de agradecer de forma especial, meu orientador Marcelo Ricardo Vicari, a quem tenho muito respeito e admiração. Obrigada professor, por ter aberto as portas para mim durante a iniciação científica, por me dar um voto de confiança e permitir desenvolver este trabalho de Mestrado. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, por todos os momentos de paciência tirando minhas dúvidas, por todas as coletas e empenho em buscar meus peixinhos, pelas cobranças, todas as conversas e acima de tudo pela amizade. Obrigada por tudo professor.

Agradeço também a todos os outros professores maravilhosos do laboratório. Realmente foi um orgulho e um prazer imenso trabalhar cercada de professores tão bons e de

tão alto nível. Obrigada professora Viviane, por todo o conhecimento compartilhado sobre Biologia Molecular, técnicas de clonagem, e por toda e qualquer dúvida esclarecida. Obrigada professora Mara, por também sempre estar disposta a esclarecer qualquer dúvida, pela disposição de ter participado das bancas de qualificação e defesa, com contribuições e esclarecimentos muito valiosos. Obrigada professor Roberto, pelas ótimas contribuições na banca de qualificação; por todos os conselhos e por estar pronto a ouvir nossos problemas e angústias. Agradeço também ao meu co-orientador Orlando Moreira-Filho, pelas coletas em campo e todas as contribuições para a realização deste trabalho. Enfim, agradeço e admiro o empenho de todos os professores para construir uma ótima Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

Gostaria de agradecer ao Miguel, uma pessoa pela qual tenho muito carinho. Obrigada Miguel, por todas as manhãs de conversa, de piadas, de músicas, enfim, por tornar nosso laboratório um ambiente divertido e muito engraçado. Obrigada por todas as “gambiarrras” feitas, para facilitar nosso serviço. Obrigada por todas as manhãs de cafés e conversas.

Agradeço muito, a todos os colegas do laboratório, que de alguma forma, em algum momento da minha vida, contribuíram para o meu conhecimento pessoal ou profissional. Quero agradecer à Tatiana, a colega que primeiro teve paciência para me ensinar as técnicas em laboratório. Gostaria de agradecer aos meninos Leonardo, Jonathan, Alain, Paulo, Rafael, Guilherme, Luís, Lucas. Agradeço às meninas Tajiana, Michele, Michele A., Diana, Bárbara, Karina, Kaline, Kamila, Jordana.

Quero agradecer especialmente à minha amigona do coração Pati. Obrigada amiga por toda a força nas coletas, nas técnicas, nas aulas, nos estudos. Obrigada por todos os almoços na sua casa. Saiba que estes dois anos de mestrado foram maravilhosos e extremamente divertidos ao seu lado. Desculpa pela má impressão que causei a você, nas primeiras vezes que me viu (espero que já tenha passado!!). Mas depois que nos conhecemos melhor, posso afirmar que considero você mais que uma amiga, uma irmãzinha. Obrigada mesmo “Fofuxa”!

À Zoli, por todo o trabalho na secretaria do mestrado, por todo o auxílio e avisos, a respeito de relatórios e a parte burocrática.

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, por fornecerem toda a infraestrutura e apoio para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Agradeço ao IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, por conceder a licença para a coleta do material zoológico utilizado.

E finalmente gostaria de agradecer a todas as pessoas direta ou indiretamente relacionadas com a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

“A possibilidade de realizar um sonho é o que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho

RESUMO

O gênero *Characidium* é o maior e mais diversificado dentro da subfamília Characidiinae. Amplamente distribuído por toda a região Neotropical, *Characidium* possui 53 espécies válidas. Estes peixes apresentam em sua maioria um número cariotípico diploide igual a 50 cromossomos, com uma fórmula cariotípica geralmente 32m+18sm. O gênero é de extremo interesse para estudos genéticos, devido à existência de inúmeras variações, a exemplo dos cromossomos supranumerários ou B em algumas populações, ocorrência de triploidia natural, diferentes posições e número dos sítios de rDNA e variação em tamanho e morfologia nos cromossomos sexuais, quando presentes. Neste trabalho, as populações/espécies *Characidium zebra*, *Characidium* cf. *zebra*, *Characidium* aff. *zebra*, *Characidium pterostictum*, *Characidium* sp., *Characidium heirmostigmata* e *Characidim gomesi* foram caracterizadas cariotipicamente. Em adição, foi obtida a sonda do cromossomo sexual W de *C. gomesi*, por microdissecção cromossômica e posterior pintura cromossômica nas outras espécies. Simultaneamente, foram localizados os sítios de rDNA 18S e 5S. A análise convencional das espécies comprovou a existência do número diploide padrão 50 cromossomos para o gênero. Por meio da técnica de bandamento C, verificou-se a ausência de sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, devido à falta do cromossomo W heterocromático, nas populações de *C. zebra*, *C. cf. zebra* e *C. aff. zebra*. Em *C. pterostictum* o sistema de cromossomos sexuais está em início de heterocromatinização e em *Characidium* sp., *C. heirmostigmata* e *C. gomesi* o sistema encontra-se altamente diferenciado, apresentando o cromossomo W completamente heterocromático. A pintura cromossômica comparativa com a sonda W-específica de *C. gomesi* nas demais espécies detectou os cromossomos sexuais de *C. pterostictum*, *Characidium* sp., *C. heirmostigmata* e *C. gomesi*. Com a sonda W-específica foram localizados blocos de regiões repetitivas em alguns cromossomos de todas as espécies analisadas, demonstrando uma provável origem comum destas regiões repetitivas e dos cromossomos sexuais. Os sítios de rDNA apresentaram distribuição espécie-específica, variando em quantidade e localização. Já foi determinado que o rDNA 45S esteve envolvido na diferenciação do par sexual de *Characidium*. As evidências cromossômicas mostraram que o par portador da RON translocou com outro autossomo para formar o par de proto cromossomo sexual do gênero. Posteriormente ocorreu uma intensa heterocromatinização do cromossomo W. Em algumas espécies a RON sofreu nova transposição para outro par autossomo, situação compartilhada em espécies onde o cromossomo W sofreu intensa heterocromatinização. Ainda, algumas espécies evidenciaram um aumento no número de sítios de rDNA 45S e 5S. Deste modo, as modificações associadas à diferenciação dos cromossomos sexuais, número e posição dos sítios de rDNA têm sido os principais agentes da evolução cromossômica em *Characidium*. Neste trabalho foi possível verificar ainda que o isolamento biogeográfico, principalmente em cabeceiras de rios e a diferenciação populacional estão intimamente associados à especiação no grupo, com posterior diversificação do sistema de cromossomos sexuais e provável surgimento de barreiras reprodutivas/cromossômicas entre as populações/espécies.

Palavras-Chave: Actinopterygii. Citogenética. Especiação.

ABSTRACT

The *Characidium* genus is the biggest and most diversified within the Characidiinae subfamily. Broadly distributed throughout Neotropical region, *Characidium* possesses 53 available species. These fishes mostly showed a karyotypic diploid number equal 50 chromosomes, with a karyotypic formula usually 32m+18sm. The genus is extremely interesting for genetic studies, due to the existence of several variations as the supernumerary or B chromosomes in some populations, the occurrence of natural triploidy, different positions and number of rDNA, sex chromosomes size and morphology variation, when they are present. In this work, the *C. zebra*, *C. cf. zebra*, *C. aff. zebra*, *C. pterostictum*, *Characidium* sp., *C. heirmostigmata* e *C. gomesi* species were karyotypically characterized. In addition, the *C. gomesi* W sex chromosome probe was obtained, through chromosome microdissection and afterward chromosome painting in other species. Simultaneously, 18S and 5S rDNA sites were located. The conventional species analysis proved the existence of the standard diploid number for the genus, $2n=50$ chromosomes. Through C banding technique, it was verified the absence of the sex chromosome system ZZ/ZW, due to the lack of heterochromatic W chromosome, in the *C. zebra*, *C. cf. zebra* and *C. aff. zebra* populations. In *C. pterostictum* the sex chromosome system is in the beginning of the heterochromatinization process and in the *Characidium* sp., *C. heirmostigmata* and *C. gomesi*, the system is found totally differentiated, showing the W chromosome completely heterochromatic. The comparative chromosome painting with the *C. gomesi* W- specific probe in the other species detected the sex chromosomes of *C. pterostictum*, *Characidium* sp., *C. heirmostigmata* and *C. gomesi*. With the W-specific probe the repetitive regions blocks were located in some chromosomes of all the analyzed species, showing a probable common origin of these repetitive regions and sex chromosome. The rDNA sites showed species-specific distribution, varying in amount and location. It has already been determined that the 45S rDNA was involved in the differentiation of the *Characidium* sex chromosome pair. The chromosomal evidences showed that the nucleolar organizing regions (NOR) carrier pair translocated with another autosome to form the proto sex chromosome pair of the genus. Afterward occurred an intense W chromosome heterochromatinization. In some species the NOR suffered a new transposition to another autosome pair, shared condition in species with extensive W chromosome heterochromatinization. Moreover, some species evidenced an increasing in the number of the 45S and 5S rDNA. Thus, the modifications associated to the differentiation of the sex chromosomes and number and position of the rDNA have been the main agents of the chromosomal evolution in *Characidium*. In this work, it was also possible verify that the biogeographic isolation, mainly in the rivers headwater and population differentiation are closely associated with the speciation in the group, afterward with sex chromosome system diversification and probable reproductive/chromosomal barrier arising among population/species.

Keywords: Actinopterygii. Cytogenetic. Speciation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Destaque da região da bacia do Alto Paraná e do rio Ribeira do Iguape evidenciando os locais de coleta representados respectivamente por letras no mapa e as espécies referentes a cada local, sendo que: A, rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi/ 1-*C. gomesi*; B, rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí/ 2-*C. heirmostigmata*; C, rio Pariquera-Açú, bacia do rio Ribeira do Iguape/ 3-*C. pterostictum*; D, rio Passa Cinco, bacia do Tietê, região Piracicaba/ 4-*C. zebra*; E, Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo rio Tietê/ 5-*C.cf. zebra*, 6-*Characidium* sp.; 7-*C. aff. zebra*.....32

Figura 2. Cariótipos das populações de *Characidium zebra*, sem heteromorfismos de cromossomos sexuais. *C. zebra* do rio Passa-Cinco, bacia do Piracicaba e Tietê (a) em coloração convencional por Giemsa e (b) bandamento C sequencial; *C. cf. zebra* das nascentes do córrego das cachoeiras, bacia do baixo Tietê (c, e) em coloração convencional por Giemsa e (d, f) bandamento C sequencial ; *C. aff. zebra* da foz do córrego das cachoeiras, bacia do baixo Tietê (g, i) em coloração convencional por Giemsa e (h, j) bandamento C sequencial. Barra = 10 µm.....55

Figura 3. Cariótipos das espécies de *Characidium* com heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW. *C. pterostictum* do rio Pariquera-Açu, bacia do Ribeira do Iguape (a) em coloração convencional por Giemsa e (b) bandamento C sequencial; *Characidium* sp. do Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo Tietê (c, e) em coloração convencional por Giemsa e (d, f) bandamento C sequencial; *C. heirmostigmata* do rio Barra Grande, bacia do Ivaí (g, i) em coloração convencional por Giemsa e (h, j) bandamento C sequencial. Barra = 10 µm.....56

Figura 4. Cariótipos das espécies de *Characidium* submetidos à dupla FISH com sonda de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Em (a) *C. zebra*; (b) *C. cf. zebra*; (c) *C. aff. zebra*; (d) *C. pterostictum*; (e) *Characidium* sp. e; (f) *C. heirmostigmata*. Barra = 10 µm.....57

Figura 5. Cariótipos das espécies de *Characidium* submetidos a dupla FISH com sonda de rDNA 18S (verde) e sonda W-específica (vermelho). Em (a) *C. zebra*; (b) *C. cf. zebra*; (c) *C. aff. zebra*; (d) *C. pterostictum*; (e) *Characidium* sp.; (f) *C. heirmostigmata* e; (g) *C. gomesi*. Barra = 10 µm.....58

Figura 6. Mapa da América do Sul com destaque para as bacias hidrográficas do Alto Paraná, São Francisco e Litorânea. Os locais de coleta foram representados por

números no mapa, sendo que a população referente ao local indicado no mapa, é identificada pelo respectivo número, na coluna NM, presente no Quadro 1.....59

Quadro 1. Relação de espécies/populações de *Characidium* estudadas quanto à variação da fórmula cariotípica; presença ou ausência, e morfologia do sistema de cromossomos sexuais; localização e número de sítios de rDNA.....52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	SISTEMÁTICA E BIOLOGIA DE <i>Characidium</i>	14
1.2	BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS TIBAGI, IVAÍ, BAIXO TIETÊ /PIRACICABA E BACIAS DO LESTE.....	15
1.3	CITOGENÉTICA DE <i>Characidium</i>	19
1.4	MICRODISSECÇÃO E PINTURA CROMOSSÔMICA.....	23
1.5	DETERMINAÇÃO CROMOSSÔMICA DO SEXO.....	26
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	METAS.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4	RESULTADOS Population differentiation and speciation in <i>Characidium</i> genus (Characiformes, Crenuchidae): reproductive and chromosomal barriers	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
7	ANEXOS.....	76

1. Introdução

1.1 Sistemática e biologia de *Characidium*

A família Crenuchidae, com cerca de 82 espécies válidas é formada pelas subfamílias Crenuchinae e Characidiinae (FROESE; PAULY, 2013). Nesta última, *Characidium* é o gênero com maior número de espécies e mais amplamente distribuído por toda a região Neotropical. Este gênero possui em torno de 53 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2013), que habitam riachos variados, considerados lênticos ou lóticos, com exceções para algumas espécies que também vivem em lagoas e banhados (BUCKUP, 1999). Apesar da grande variedade de espécies, *Characidium* possui morfologia homogênea, apresentando porte pequeno de no máximo 15 cm de comprimento (BUCKUP, 1993,1999).

O gênero *Characidium* possui espécies insetívoras bentônicas, que se alimentam de fragmentos de insetos incluindo principalmente Chironomidae, Simuliidae, Trichoptera e Ephemeroptera (ROLLA; ESTEVES; ÁVILA-DA-SILVA, 2009). Nas suas estratégias alimentares utiliza de táticas como “predação de senta e espera”, “caça por especulação” e até táticas modificadas de forrageio de senta e espera (LEITÃO; CARAMASCHI; ZUANON, 2007). Apesar de não possuir cores chamativas, os peixes deste gênero possuem importância para a aquariofilia, descritos como ágeis, pacíficos, resistentes, sendo conhecidos pelo nome popular de “Mocinha”.

Os peixes Crenuchidae foram removidos da família Characidae, onde constituíam a subfamília Crenuchinae e, na década de 90 foram considerados como uma nova família monofilética (BUCKUP, 1998). Não existe uma revisão mais atual das espécies de *Characidium*, entretanto novas espécies são constantemente descritas, a exemplo de: *Characidium stigmosum* (MELO; BUCKUP, 2002), *Characidium longum* (TAPHORN; MONTANA; BUCKUP, 2006), *Characidium xanthopterum* (SILVEIRA et al., 2008), *Characidium heirmostigmata* (GRAÇA; PAVANELLI, 2008), entre outras.

1.2 Bacias hidrográficas dos Rios Tibagi, Ivaí, Baixo Tietê /Piracicaba e bacias do Leste

Bacias hidrográficas são conjuntos de terras, drenadas por seus rios e afluentes. São sistemas abertos que recebem energia do meio através de agentes climáticos e perdem energia através do deflúvio ou escoamento de suas águas. Da parte mais alta do relevo, a água das chuvas pode escoar de maneira superficial, formando os rios e riachos; mas pode também infiltrar no solo promovendo a formação de nascentes ou de lençóis freáticos. As cabeceiras são formadas por riachos que brotam do terreno em regiões mais íngremes e altas, e à medida que os riachos vão se juntando, aumentam de volume formando os rios (TEODORO et al., 2007).

A diversidade dos organismos presentes em uma bacia hidrográfica é a resultante do processo de evolução histórica das espécies em uma área que se manteve geomorfologicamente isolada das outras áreas onde se localizam as demais bacias hidrográficas (WEITZMAN; MENEZES; WEITZMAN, 1988). De modo geral, uma grande bacia hidrográfica, a exemplo da bacia do rio Paraná pode conter um grande número de bacias hidrográficas menores, parcialmente isoladas em fluxo gênico umas das outras, para as espécies não migratórias e de pequeno porte. Entre estas várias bacias menores, as características topográficas e fisionômicas proporcionam uma ampla gama de ambientes distintos, o que favorece a ocorrência de espécies adaptadas a um subconjunto particular destes ambientes, principalmente nas regiões das cabeceiras destes rios (MENEZES et al., 1990). Desta forma, as cabeceiras dos rios apresentam uma predominância de espécies de pequeno porte, com limitado potencial de dispersão espacial (MENEZES et al., 1990). Tais espécies tendem a ser mais susceptíveis à especiação, visto que suas populações localizadas podem divergir geneticamente das demais com maior rapidez em relação àquelas das espécies típicas de grandes rios (WEITZMAN; MENEZES; WEITZMAN, 1988).

A bacia hidrográfica do Alto Rio Paraná é uma das cinco divisões existentes do rio Paraná e compreende o trecho de Guaíra às nascentes dos rios Grande e Paranaíba, possuindo como principais limites geográficos as bacias do rio Grande e Paranaíba e Serra de Caiapó ao norte, a leste o maciço Litorâneo Brasileiro (Serra do Mar), ao sul da bacia do rio Iguaçu, afluente do médio Paraná, e a oeste a bacia do rio Paraguai e a Serra de Maracaju, representando o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul (SALLUN;

SUGUIO; STEVAUX, 2007). Entre estas drenagens ocorrem importantes bacias hidrográficas menores, cada uma com um conjunto peculiar de organismos. Apesar da ictiofauna do Alto Paraná ser uma das mais conhecidas e estudadas, o número de espécies descritas ou referidas para a área tem crescido exponencialmente, o que indica que a riqueza apresentada está longe de representar a realidade (LANGEANI et al., 2007). O Alto Paraná abriga cerca de 310 espécies de peixes, agrupadas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007).

O Alto Paraná é uma área complexa devido às atividades tectônicas pelas quais têm passado desde o início do Terciário (AB'SABER, 1998). Essas atividades, associadas ao complexo sistema de falhas existentes na área, são as principais causas de diversos eventos de captura de cabeceiras, como ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (CASTRO et al., 2003), e que foram responsáveis pela distribuição de algumas de suas espécies também em drenagens vizinhas, tais como: rios Paraíba do Sul, Ribeira do Iguape e algumas drenagens litorâneas menores (LANGEANI, 1989; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2006; SERRA; CARVALHO; LANGEANI, 2007; WEITZMAN; MALABARBA, 1999), no Rio São Francisco (BRITSKI; SATO; ROSA, 1986; BRITTO; CASTRO, 2002) ou ainda nas cabeceiras dos rios Tibagi, Iguaçu, Ivaí e Ribeira do Iguape (VICARI; ARTONI; BERTOLLO, 2005; VICARI et al., 2006). Malabarba (1998) sugere a existência de conexões pretéritas entre o rio Tietê e drenagens costeiras através de uma conformação antiga do vale do rio Paraíba; essas conexões podem também ter ocorrido em outras porções do Alto Paraná, o que precisaria ser melhor investigado através de estudos filogenéticos e biogeográficos dos grupos de peixes que ocorrem nessas bacias e também por meio de evidências geológicas desses eventos de captura de drenagens.

A bacia hidrográfica do rio Tibagi (Alto Paraná) possui como coordenadas geográficas centrais 24°18' de latitude sul e 50°37' de longitude oeste, compreendendo um total de 41 municípios inseridos total ou parcialmente na Bacia, destacando-se principalmente Ponta Grossa, Castro, Tibagi, Telêmaco Borba, Londrina, Cornélio Procópio e Apucarana. Possui uma área total de cerca de 25.000 km², abrangendo altitude de 300 - 1200 m (VALENTE et al., 2011).

De acordo com Shibatta et al. (2002), foram registradas 110 espécies de peixes na bacia do rio Tibagi. Destas 110 espécies, Characiformes representam 42,7% (47 espécies, nove famílias); Siluriformes, 42,7% (47 espécies, nove famílias); Perciformes, 6,4% (7

espécies, duas famílias); Gymnotiformes, 4,5% (5 espécies, três famílias); Cyprinodontiformes, 2,7% (3 espécies, uma família) e Synbranchiformes, 0,9% (1 espécie). Outro trabalho realizado por Shibatta; Gealh e Bennemann (2007) permitiu a descoberta de mais 13 espécies para a bacia do rio Tibagi, sendo que mais tarde um total de 151 espécies foram descritas para a bacia (RAIO; BENNEMANN, 2010).

A segunda maior bacia hidrográfica do estado do Paraná é a do Rio Ivaí, perdendo apenas em tamanho para a bacia do rio Iguaçu. A bacia do rio Ivaí está inserida na região sul do Brasil e, situada entre as coordenadas geográficas 22°56'17" - 25°35'27" de latitude sul e 50°44'17" - 53°41'43" de longitude oeste e faz parte da drenagem do Alto Paraná. Possui uma área de 36.587 km² e um percurso de 680 km. Sua nascente ocorre no sudeste do estado pelo rio dos Patos e São João na Serra da Boa Esperança no segundo planalto (DESTEFANI, 2005). Nesta bacia ocorre uma predominância de Characiformes e Siluriformes e recentemente a espécie *Characidium heirmostigmata* foi descrita com localidade tipo nas nascentes da bacia do rio Ivaí, na região de Prudentópolis – PR (GRAÇA; PAVANELLI, 2008).

A bacia do Rio Tietê é uma unidade hidrográfica da Bacia do Rio Paraná, composta por seis sub-bacias: Alto Tietê, onde está inserida a Região Metropolitana de São Paulo; Piracicaba; Sorocaba/Médio Tietê; Tietê/Jacaré; Tietê/Batalha e Baixo Tietê (SÃO PAULO, 2009). O baixo Tietê possui como cursos d'água principais o Rio Paraná e seu afluente Ribeirão do Abrigo ou Moinho, Rio Tietê e seus afluentes Ribeirão Lajeado, Ribeirão Azul ou Aracanguá, Ribeirão Macaúbas e Ribeirão Santa Bárbara. Localiza-se na região oeste do Estado de São Paulo, com uma extensão de mais ou menos 200 km, sendo composta por 42 municípios. Limita-se a norte e oeste com a UGRHI (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos) São José dos Dourados, a leste e sudeste com a UGRHI Tietê Batalha, a sul com as UGRHI Aguapei-Peixe e a oeste com o Rio Paraná (SÃO PAULO, 2009). Poucos são os estudos de levantamento da ictiofauna da região do baixo rio Tietê, geralmente restritos as represas (ROCHA et al., 2011).

As bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, incluindo os rios Camanducaia, Atibaia, Jaguari e Corumbataí, abrangem uma área de 15.303,67 km² que fazem parte da bacia do rio Tietê em sua porção média. No contexto do Estado de São Paulo, inserem-se na região leste/nordeste até os limites com o Estado de Minas Gerais, chegando inclusive, a abranger uma pequena parte do seu território (SHS, 2012). Em relação à análise da diversidade de

peixes, um levantamento recente realizado a montante desta região, nas cabeceiras do Tietê, mostrou a presença de 56 espécies de peixes das ordens Clupeiformes, Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes, Perciformes, Synbranchiformes (MARCENIUK; HILSDORF; LANGEANI, 2011).

Por sua vez, a bacia do rio Pariquera-Açú é uma sub-bacia do rio Ribeira do Iguape. A bacia do rio Ribeira do Iguape encontra-se na região sudeste de São Paulo e do leste do Paraná, aproximadamente entre 23°50' - 25°30' de latitude sul e 46°50' - 50°00' de longitude oeste. Compreende uma área total de 24.980 km², sendo que 15.480 km² (62%) pertencem ao Estado de São Paulo e 9.500 km² (38%) pertencem ao Estado do Paraná (PARANÁ, 2009). Uma das principais características da fauna de peixes do rio Ribeira do Iguape, como também de todas as outras bacias hidrográficas localizadas nas regiões da Floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica, é o seu elevado grau de endemismo, resultado de processos históricos de isolamento (BIZERRIL, 1994).

1.3 Citogenética de *Characidium*

O gênero *Characidium* possui um número diploide de $2n = 50$ cromossomos, sendo predominantemente meta-submetacêntricos (CENTOFANTE et al., 2003). Esta macroestrutura cariotípica foi geralmente observada nas espécies estudadas até agora, dentre as quais se encontram *Characidium zebra*, *Characidium gomesi*, *Characidium pterosticum*, *Characidium oiticicai*, *Characidium lauroi*, *Characidium lanei*, *Characidium schubarti*, *Characidium alipioi*, *Characidium fasciatum*, *Characidium* sp., *Characidium* cf. *lagosantense* (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003; MACHADO et al., 2011; MAISTRO et al., 1998; MAISTRO et al., 2004; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011; PAZIAN et al., 2013; SILVA; MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008). Até o momento, apenas duas populações, sendo uma de *C. lanei* e a outra de *C. pterostictum* apresentaram exceção à fórmula cariotípica de m/sm, com um par de cromossomos acrocêntricos no cariótipo (NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010).

Entretanto, o gênero apresenta diferenças cariotípicas, como a ocorrência de cromossomos supranumerários ou cromossomos B (MAISTRO et al., 1998; PANSONATO-ALVES et al., 2010), ocorrência natural de triploidia (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001), sítios de rDNA em diferentes posições (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010; VICARI et al., 2008); a presença ou ausência de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; MAISTRO et al., 1998; 2004; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011; SILVA; MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008).

Nos estudos morfológicos, *Characidium zebra* ocupa uma posição basal na filogenia de *Characidium* (BUCKUP, 1993). Com apoio da filogenia baseada em morfologia, Vicari et al. (2008) propuseram que os dados citogenéticos encontrados em *C. zebra*, $2n = 50$ cromossomos, 32m/18sm, ausência de cromossomos sexuais heteromórficos, um único par portador de Região Organizadora de Nucléolo (RON) e heterocromatina pericentromérica seriam estados plesiomórficos para estas características neste gênero. Pazian et al. (2013) corroboraram a posição basal de *C. zebra* quanto às características cromossômicas ao utilizar o grupo irmão *Crenuchus*. Pansonato-Alves et al. (2010) relataram que o segundo par

metacêntrico em *C. zebra* corresponde ao par de cromossomos sexuais heteromórficos e, que este provavelmente sofreu diversas alterações durante a formação do ZW.

Em *Characidium* a diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos é uma característica de grande interesse em estudos evolutivos. Em *C. fasciatum* foi descrito um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW para populações do córrego Quinta e rio Pardo (MAISTRO et al., 1998). Mais tarde, Centofante et al. (2003) baseados nas características morfológicas afirmaram que populações descritas por Maistro et al. (1998), como *C. cf. fasciatum*, poderiam se tratar de *Characidium* sp. cf. *C. gomesi*. Populações de *C. gomesi* apresentam cromossomos sexuais ZW em alto grau de diferenciação (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; PAZIAN et al., 2013; VICARI et al., 2008). De forma similar, as espécies *C. alipioi* e *C. fasciatum* também apresentaram o cromossomo sexual W altamente heterocromático (CENTOFANTE et al., 2003; PAZIAN et al., 2013).

Vicari et al. (2008) descreveram a ocorrência de pequena banda heterocromática proximal no braço longo do cromossomo Z, assim como o cromossomo W totalmente heterocromático no par de cromossomos sexuais em *Characidium gomesi*. Com estes resultados propuseram que as diferentes morfologias dos cromossomos Z e W encontradas eram decorrentes tanto de rearranjos estruturais, quanto de amplificação da heterocromatina a partir de um par ancestral similar ao Z. Posteriormente, Pansonato-Alves et al. (2010) estudaram sete espécies de *Characidium*: *C. zebra*, *C. schubarti*, *Characidium* sp., *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lauroi* e *C. lanei*. *Characidium zebra* foi a única a não apresentar sistema de cromossomos sexuais heteromórficos e todas as demais apresentaram cromossomos sexuais em estágios intermediários de diferenciação com a presença de RON na região terminal (PANSONATO-ALVES et al., 2010).

Posteriormente, Vicari et al. (2010) obtiveram uma sonda do cromossomo sexual W de *C. gomesi* sem a presença de rDNA e mapearam sobre o cariótipo de *C. lanei*, evidenciando o par ZW desta espécie portadora do rDNA 18S. Após, Machado et al. (2011) utilizaram a sonda do cromossomo W em procedimentos de pintura cromossômica comparativa aliada a sonda do rDNA 18S em *C. zebra*, *C. lauroi* e quatro diferentes populações de *C. gomesi*. Estes resultados mostraram ausência de cromossomos sexuais heteromórficos na espécie *C. zebra*. Já a espécie *C. lauroi* mostrou a RON nos cromossomos Z e W e um estágio inicial da diferenciação dos cromossomos sexuais (MACHADO et al.,

2011). Por sua vez, uma população de *C. gomesi* (rio Alambari) evidenciou as RONS na região terminal dos cromossomos sexuais altamente heterocromáticos, enquanto as demais mostraram o W totalmente heterocromático, sem rDNA e com diferentes morfologias (MACHADO et al., 2011). Deste modo, estes autores propuseram que a origem dos cromossomos sexuais em *Characidium* foi a partir de uma translocação do par portador da RON, semelhante ao encontrado em *C. zebra*, para um par autossômico, formando o par sexual ZW, segundo metacêntrico em tamanho no cariótipo, similar ao encontrado no estágio inicial de *C. lauroi*. Por sua vez, em *C. gomesi* a RON sofreu nova translocação em algumas populações, sendo este rearranjo positivamente selecionado e compartilhado em espécies que apresentam alto grau de diferenciação heterocromática do cromossomo W (MACHADO et al., 2011).

Recentemente, uma sonda produzida a partir do cromossomo sexual W de *C. cf. fasciatum* foi utilizada na hibridação *in situ* fluorescente nas espécies *C. cf. gomesi*, *Characidium* sp. e na própria espécie *C. cf. fasciatum*, evidenciando o cromossomo W totalmente heterocromático e um bloco heterocromático pericentromérico no cromossomo Z, em todas as espécies, com a ausência de sítios de RON sobre os sexuais (PAZIAN et al., 2013). A mesma sonda foi mapeada sobre o cariótipo de *C. cf. zebra*, *C. cf. lagsantense* e a espécie de um grupo irmão *Crenuchus pilurus*, evidenciando nenhum sinal de hibridação (PAZIAN et al., 2013).

Além do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais em *Characidium*, está a movimentação do sítio de rDNA 45S nos genomas do gênero. A RON presente sobre os cromossomos sexuais é a condição mais frequente, à exceção de *C. gomesi*, *C. alipioi*, *C. cf. fasciatum*, *C. cf. lagsantense* e *C. zebra*, sendo que as duas últimas não possuem cromossomos sexuais (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003; MACHADO et al., 2011; MAISTRO et al., 1998; MAISTRO et al., 2004; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011; PAZIAN et al., 2013; SILVA; MAISTRO, 2006; VICARI et al., 2008). Desta forma, a localização física destes sítios por hibridação *in situ* fluorescente tem evidenciado posições diferenciadas para algumas populações de uma mesma espécie (PANSONATO-ALVES et al., 2011; VICARI et al., 2008) e algumas vezes apresentando múltiplos sítios (VICARI et al., 2008).

Neste sentido, *Characidium* é um gênero de extrema importância para a citogenética e para estudos evolutivos. Além disso, tem sido utilizado como um dos organismos modelo de

peixes Neotropicais em estudos da diferenciação sexual, devido à variação presente em suas espécies, a qual é decorrente de rearranjos cromossômicos e também por apresentar um genoma dinâmico resultante da movimentação de sequências repetitivas.

1.4 Microdissecção e pintura cromossômica

A microdissecção cromossômica foi originalmente desenvolvida em estudos envolvendo bandas dos cromossomos politênicos de *Drosophila* como uma forma de obter marcadores de DNA de regiões cromossômicas específicas (SCALENGHE et al., 1981). A microdissecção foi utilizada para obter clones de bandas individuais dos cromossomos politênicos, sendo conhecido como microdissecção e microclonagem. Esta técnica foi então aplicada em cromossomos de ratos e posteriormente estendida para humanos (BATES et al., 1986; RÖHME et al., 1984). Atualmente a microdissecção tem sido amplamente utilizada em procedimentos de pintura cromossômica comparativa e para obtenção de produtos para sequenciamento do DNA (CHEN et al., 2012; VICARI et al., 2010).

A preparação de sondas de cromossomos microdissectados para pintura envolve um passo inicial de amplificação do genoma total (*whole genome amplification* - WGA). O procedimento de WGA foi desenvolvido para aumentar a quantidade de DNA inicial em amostras com pequenas quantidades de DNA (TELENIUS et al., 1992; ZHANG et al., 1992). Inúmeras técnicas de WGA têm sido desenvolvidas, as quais diferem em seus protocolos e acurácia de replicação.

O método de WGA mais utilizado após a microdissecção para aplicação em pintura cromossômica comparativa é a *degenerate-oligonucleotide-primed* PCR (DOP-PCR). A DOP-PCR foi desenvolvida por Telenius et al. (1992) e este método tem sido modificado por inúmeros grupos de citogeneticistas para amplificação de cromossomos microdissectados com aplicação na pintura cromossômica total (VICARI et al., 2010; WEISE et al., 2010).

A mais amplamente utilizada aplicação da microdissecção é a localização da região alvo no procedimento de pintura cromossômica. Este procedimento é utilizado em cariótipos humanos rearranjados para identificar a origem da alteração cromossômica ou dos *double minutes* com aplicação no diagnóstico de síndromes, câncer, entre outros (ARENS et al., 2004; MAHJOUBI; HILL; PETERS, 2006; VERMEESCH et al., 2005). Nos demais grupos de organismos a pintura cromossômica tem sido utilizada para identificar a origem de cromossomos B (TERUEL et al., 2009; VICARI et al., 2011; VOLTOLIN et al., 2010); a origem e diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos em grupos de organismos próximos (FUKOVÁ et al., 2007; HIRAI; HIRAI; LOVERDE, 2012; MACHADO et al.,

2011; SAHARA; YOSHIDO; TRAUT, 2012; SCHEMBERGER et al., 2011) e nos estudos de rearranjos de genomas por Zoo FISH (FERGUSON-SMITH; TRIFONOV, 2007; RENS et al., 2007).

Nos últimos anos houve um grande progresso no mapeamento gênico nos genomas de organismos considerados modelo para estudo. Em contradição a este grande avanço, no genoma da grande maioria dos grupos de organismos, os marcadores gênicos ou de DNAs repetitivos são escassos ou inexistentes. Nestes grupos, a microdissecção cromossômica e a clonagem de fragmentos têm sido uma alternativa rápida e eficiente para a geração de sondas, principalmente aquelas de elementos repetitivos de DNA (VICARI et al., 2010). Os clones destas bibliotecas específicas de uma região ou banda cromossômica podem ser utilizados em conjunção com marcadores já existentes para a construção de mapas de ligação genético e, mais facilmente, para a localização física de elementos repetitivos, providenciando uma ferramenta importante para o entendimento da estrutura cromossômica e da organização de regiões específicas do genoma (ZHOU; HU, 2007).

Os estudos de citogenética comparativa tradicionalmente utilizam das análises do padrão de distribuição de bandas nos cariótipos. Entretanto, quando consideramos grupos de espécies com os genomas altamente rearranjados, ou espécies altamente divergentes, estudos citogenéticos de comparação de bandas provaram ser insuficientes (CHOWDHARY; RAUDSEPP, 2001). Desta forma, a pintura cromossômica comparativa associada com os marcadores cromossômicos clássicos e moleculares tem sido o método mais apropriado para estudos de alterações nos genomas e citogenética comparativa (CHOWDHARY; RAUDSEPP, 2001; SCHEMBERGER et al., 2011). A vantagem deste método é a identificação de regiões genômicas homólogas entre espécies em procedimentos de hibridação *in situ* de cromossomos inteiros (RÁB et al., 2008).

A síntese de sondas para pintura cromossômica oferece novas oportunidades para a análise da diferenciação dos cromossomos de grupos de espécies (VICARI et al., 2010). Assim, a pintura cromossômica permite a hibridação de sondas heterólogas, as quais têm revelado que grupos de ligação têm sido conservados para grandes segmentos genômicos em vários mamíferos (BEKLEMISHEVA et al., 2011; PICONE et al., 2011) e outros grupos (BILTUEVA et al., 2011; NANDA et al., 2011).

Especificamente no grupo dos peixes Neotropicais, a microdissecção cromossômica e a pintura cromossômica têm sido utilizadas para tentar elucidar a origem e composição dos

cromossomos Bs em algumas espécies, como por exemplo, *Prochilodus lineatus* (VOLTOLIN et al., 2010) e *Astyanax scabripinnis* (VICARI et al., 2011). No entanto, os cromossomos B divergem quantitativamente ao longo do tempo por meio da evolução de sequências e qualitativamente por meio de rearranjos cromossômicos. Devido à ausência de pressão de seleção, mutações acumulam e a recombinação é prevenida. Estes eventos presumem que há uma perda de locos funcionais nos cromossomos B (GREEN, 1990). Devido a toda esta diferenciação estrutural e de sequências do cromossomo B, a pintura de cromossomos B altamente diferenciados tendem a ter pouco ou nenhum reconhecimento de sítios no complemento A e quando são detectados sinais visíveis, estes geralmente são regiões compostas de sequências repetitivas (em fase de elaboração)¹.

A origem dos sistemas de cromossomos sexuais em peixes é outro tema amplamente estudado utilizando a microdissecção e a pintura cromossômica comparativa. Na origem dos cromossomos sexuais, dois fatores principais auxiliam na diferenciação entre os cromossomos do par proto sexual por meio da perda de recombinação: a amplificação de modificadores genéticos e rearranjos cromossômicos. Rearranjos como translocações e inversões causam a redução ou supressão de *crossing over* em regiões próximas ao ponto de quebra. Nestas regiões onde o *crossing over* ficou reduzido ou ausente, existe uma tendência de acúmulo de sequências de DNA satélite ou de elementos transponíveis. Regiões de acúmulo de DNA satélite (heterocromáticas) são conhecidas pela ausência de *crossing over*. Devido a inserções destes elementos e DNA satélite, as regiões vizinhas adjacentes à região sem recombinação, também estariam restritas ao *crossing over* (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005). Desta forma, a geração de sondas para pintura a partir de cromossomos sexuais diferenciados evidencia, em hibridações comparativas em um grupo de espécies, possíveis regiões do par de proto cromossomos sexuais naquelas espécies que não apresentam o heteromorfismo de cromossomos sexuais, ou as regiões homólogas dos cromossomos diferenciados (MACHADO et al., 2011).

Neste novo contexto, a citogenética de peixes Neotropicais busca não somente estudos de comparações clássicas, mas tenta utilizar da citogenética molecular para integrar dados com a genômica e entender os mecanismos que geram a variação e a função dos segmentos cromossômicos.

¹VICARI, M. R.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F. Microdissection and Chromosome Painting. In: OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; FORESTI, L. A.; PISANO, E.; KAPOOR, B. G. (Eds.) **Techniques of Fish Cytogenetics**. USA: Science Publisher.

1.5 Determinação cromossômica do sexo

A diferenciação sexual é guiada por vários elementos, tais como fatores ambientais e genéticos (KONDO et al., 2003; ZHANG et al., 2009). Quando a determinação sexual ocorre por influência ambiental, a mesma se dá na maioria das vezes por diferença de temperatura, diferenciação denominada temperatura-dependente, ocorrendo em um estágio do organismo denominado termo-sensitivo (ZHANG et al., 2009). Existe uma imensa variedade de mecanismos de determinação sexual, como em peixes, onde a determinação pode ocorrer por estímulos hormonais, sendo que andrógenos determinam sexo masculino e os estrógenos o sexo feminino (ZHANG et al., 2009). Pode ser também por estímulos ambientais, diferentes formas de hermafroditismo, sistemas clássicos de cromossomos sexuais ZZ/ZW, XX/XY ou múltiplos (KONDO et al., 2003; SCHEMBERGER et al., 2011). Em insetos, por exemplo, a variedade de sistemas de cromossomos sexuais é muito grande, sendo que coleópteros apresentam sistemas sexuais do tipo Xy_p (POSTIGLLONI; BRUM-ZORRILLA, 1988; GOLL et al., 2013), sistemas múltiplos de cromossomos sexuais (GALIÁN; HOGAN; VOGLER, 2002), cromossomos sexuais do tipo XX/XY, XX/X0 (SERRANO; YADAV, 1984); além de sistemas XX/X0 encontrados em hemípteros (NEGRI et al., 2006), ZZ/ZW em lepidópteros (LUKHTANOV, 2000), entre outros.

Sistema de cromossomo sexual ocorre com a presença dos cromossomos sexo específicos. Os denominados cromossomos sexuais devem conter genes para a determinação do sexo. No nível de genética molecular, existem inúmeros genes relacionados com a determinação sexual, porém a exata função de cada um destes e seu papel na diferenciação dos sexos ainda não é bem compreendida, a exceção de humanos (ZHANG et al., 2009).

Nos cariótipos de muitas espécies é possível encontrar cromossomos sexuais heteromórficos, nos quais os cromossomos específicos de cada sexo podem ser muito diferenciados em morfologia. Os sistemas de cromossomos sexuais onde o macho é heterogamético são denominados XX/XY, já quando a fêmea é heterogamética o sistema é denominado ZZ/ZW. Para alcançar o estado de cromossomos sexuais heteromórficos, estes cromossomos sofreram várias etapas de diferenciação ao longo de milhares de anos, evoluindo a partir de um par de cromossomos autossômico ancestral. Esta hipótese foi criada a partir da observação de sistemas de cromossomos sexuais em diversas etapas da evolução,

desde sistemas onde o X e o Y, por exemplo, são dificilmente distinguíveis morfologicamente até sistemas completamente heteromórficos (MULLER, 1964). Em peixes neotropicais, estas etapas da diversificação de cromossomos sexuais foram observadas em alguns grupos, a exemplo dos gêneros *Triportheus*, *Characidium*, *Leporinus* e família Parodontidae (DINIZ; LAUDICINA; BERTOLLO, 2009; MACHADO et al., 2011; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; SCHEMBERGER et al., 2011). Essa mesma situação tem sido observada para grupos de insetos (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005) e outros vertebrados (BULL, 1980; EGGERT, 2004; MATSUBARA et al., 2006). Em anfíbios são encontrados os sistemas XX/XY e ZZ/ZW, em diferentes graus de heterocromatinização (EGGERT, 2004). Em répteis, à exceção de tartarugas, os cromossomos sexuais ocorrem na ordem Squamata, onde também são encontrados com diversos graus de diferenciação (BULL, 1980).

Na evolução de um par de cromossomos sexuais, a partir do par autossômico ancestral, ocorre uma mutação levando a heterozigose em um dos sexos e mantendo a homozigose no outro, estabelecendo desta forma, um sistema de cromossomos sexuais inicial - proto cromossomos sexuais - (MATSUBARA et al., 2006). Na região determinante sexual deve ocorrer a supressão da recombinação para manutenção deste (s) loco (s) restrito (s) ao cromossomo diferenciado. Em adição a esta, outras mutações vantajosas podem ocorrer apenas no sexo heteromórfico, permanecendo deletérias no sexo homomórfico. Estas mutações levariam os dois cromossomos sexuais a sofrer diferentes pressões seletivas, aumentando ainda mais a supressão na recombinação. Esta supressão de recombinação meiótica entre um par de cromossomos homomórficos (homólogos), que progressivamente acumularam os genes determinantes do sexo é seguida por rearranjos cromossômicos estruturais como deleções, inserções, acúmulo de elementos transponíveis e expansão de sequências repetitivas (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005).

A heterocromatina tem como componente principal unidades de DNA satélite, no entanto, estas regiões são também enriquecidas por elementos transponíveis, micro e minissatélites (MAZZUCHELLI; MARTINS, 2009; SUMNER, 2003). Nas últimas décadas foi verificado um importante papel regulatório para os blocos heterocromáticos (SUMNER, 2003). O crescente aumento de heterocromatina também é capaz de silenciar genes vizinhos. Durante a evolução dos cromossomos sexuais, o cromossomo heteromórfico passa por um processo de degeneração, onde se percebe o acúmulo de outras mutações, deleções e duplicações, aumento da expansão de sequências altamente repetitivas em *tandem*, acúmulo

de retrotransposons e a presença de poucos genes vitais neste cromossomo. Desta forma, mecanismos de compensação de dose formados pelo cromossomo sexual homomórfico estão sujeitos à seleção positiva (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005).

Na espécie *Oryzias hubbsi*, o cromossomo W é maior que o Z, indicando que sua degeneração ainda não ocorreu totalmente nesta espécie. O processo de degeneração começa a se espalhar por todo o cromossomo, permanecendo neste apenas genes com vantagem sexo-específico (TAKEHANA et al., 2007). O aumento da expansão de retrotransposons e da heterocromatina diminui ainda mais a recombinação entre os cromossomos sexuais, anteriormente homólogos, fazendo com que cada um evolua de maneira independente. Nos estágios finais da diferenciação, os cromossomos se apresentam totalmente heteromórficos (TAKEHANA et al., 2007).

Algumas situações como translocações ou inversões, podem tornar cromossomos homólogos assimétricos, levando a uma falta de recombinação entre eles, causando alterações na distribuição de DNA satélite. Sequências RUSI, uma família de DNA satélite associada aos telômeros, encontrada exclusivamente em *Rumex induratus* e *Rumex scutatus*, foram localizadas por hibridação *in situ* em regiões centroméricas. O fato da mesma sequência associada ao telômero estar presente no centrômero, indica que mecanismos de reorganização ocorreram no cromossomo, levando a uma distribuição diferenciada deste tipo de DNA satélite. Esta distribuição diferenciada e posterior amplificação do DNA satélite ocorrem em regiões de cromossomos específicos tais como cromossomos sexuais, cromossomos B, microcromossomos (NAVAJAS-PÉREZ et al., 2009), entre outros, promovendo diferenciação dos cromossomos em questão.

No sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, o cromossomo heteromórfico W geralmente é parcialmente ou inteiramente heterocromático (GUERRA, 1988). Heterocromatina é um tipo de cromatina que se encontra altamente condensado, na maioria das vezes apresentando ausência de atividade gênica, e replicação tardia do DNA (GUERRA, 1988). A cromatina pode ser do tipo eucromatina ou heterocromatina. A eucromatina é dividida em eucromatina constitutiva ou heterocromatina facultativa. O primeiro tipo constitui as bandas R, onde estão presentes genes que possuem atividade de manutenção do organismo (*house keeping*), como aqueles responsáveis pela replicação, transcrição e controle do ciclo celular. Já a heterocromatina facultativa faz parte das bandas G, que comporta genes com funções tecido-específicas (HOLMQUIST; ASHLEY, 2006).

A heterocromatina constitutiva (permanente) pode ser do tipo heterocromatina α ou heterocromatina β . O tipo α é geralmente desprovido de genes, caracterizado pela replicação tardia e se encontra em blocos positivos para bandamento C. Por sua vez, a heterocromatina do tipo β é caracterizada por ser um depósito de retrotransposons. Porta alguns genes, sendo que alguns deles podem exigir o estado heterocromático, para permanecerem ativos. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, há 297 genes dentro ou próximos de regiões β heterocromáticas, sendo apenas ativos nestas condições (HOLMQUIST; ASHLEY, 2006).

À exceção de *C. zebra* e *C. lagosantense*, as espécies do gênero *Characidium* apresentam o sistema de cromossomo sexual do tipo ZZ/ZW, sendo o cromossomo W parcialmente ou completamente heterocromático. Sendo assim, a obtenção do conhecimento a respeito da dinâmica de diferenciação dos cariótipos de *Characidium*, essencialmente associada à diferenciação e composição dos cromossomos sexuais, torna necessária a busca por mecanismos que auxiliem a entender a origem destes cromossomos por pintura cromossômica, importantes para um melhor entendimento também da história evolutiva de *Characidium*.

2. Justificativa e objetivos

Os peixes Neotropicais apresentam ampla diversidade quanto a mecanismos cromossômicos de determinação do sexo. Dentre os peixes Neotropicais, o gênero *Characidium* possui espécies que podem ou não apresentar sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. Neste sistema de cromossomos sexuais, a fêmea apresenta heterogametia, portando os cromossomos Z e W, sendo este último parcialmente ou inteiramente heterocromático.

Este projeto objetivou a caracterização citogenética de diversas espécies do gênero *Characidium*, com a descrição cariotípica, localização física dos sítios de rDNA 18S e 5S e o aprofundamento de conhecimentos para a compreensão da evolução do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW no gênero, por meio da obtenção da sonda do cromossomo W e sua localização física nas espécies estudadas. Desta forma, foram realizadas análises comparativas a respeito da história evolutiva do sistema ZZ/ZW, associadas aos mecanismos

de isolamento reprodutivo e a dinâmica das bacias hidrográficas buscando entender a especiação em *Characidium*.

Assim, foi objetivo deste projeto:

Geral

Entender o mecanismo de diferenciação dos cromossomos sexuais relacionando à dinâmica das bacias hidrográficas e ao isolamento reprodutivo para a especiação no gênero *Characidium*.

Metas

- a) caracterizar cariotipicamente diversas populações de diferentes espécies do gênero *Characidium*;
- b) utilizar marcadores cromossômicos para análises comparativas entre espécies e populações em estudo;
- c) realizar uma análise comparativa da diferenciação e evolução do cromossomo W entre diferentes espécies de *Characidium* que possuem o sistema ZZ/ZW;

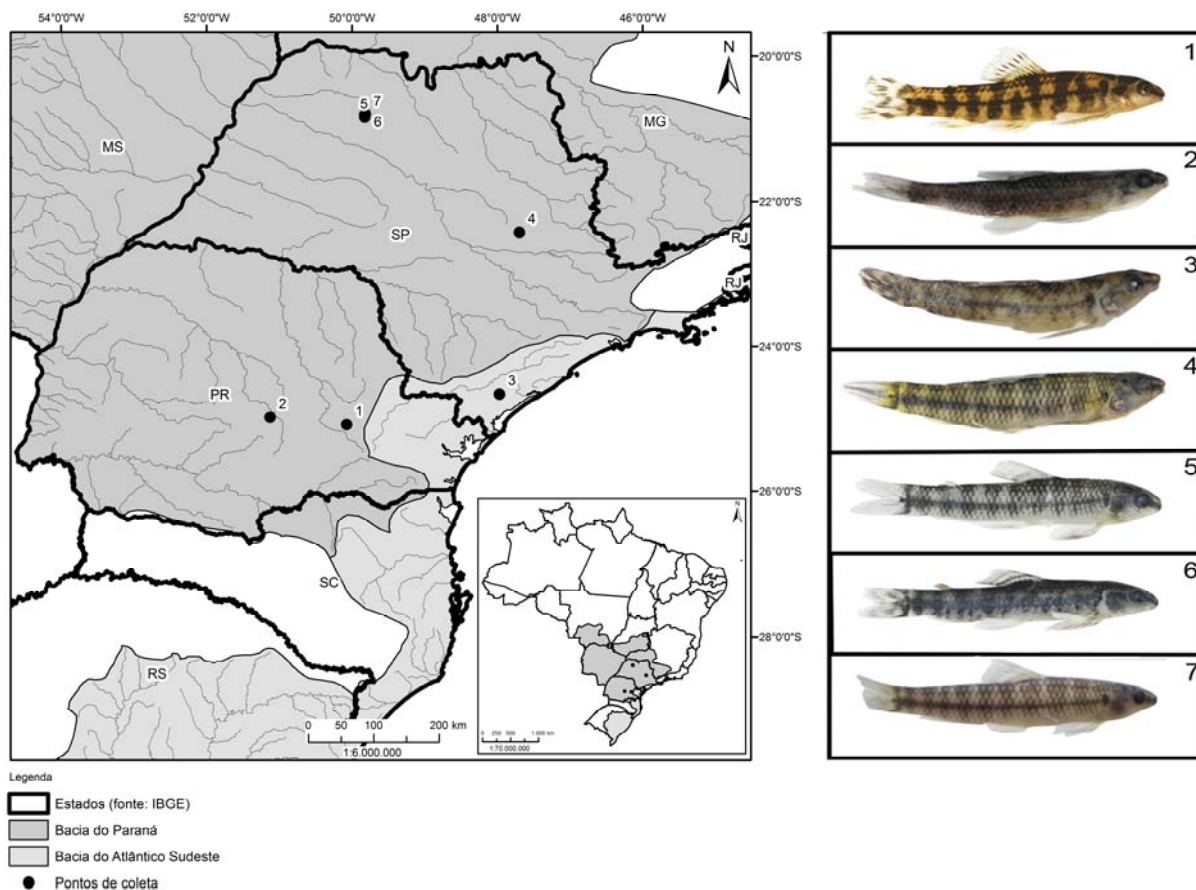
3. Material e métodos:

3.1 Material Biológico e Locais de Coleta

Para o estudo foram utilizados indivíduos adultos de sete espécies/populações diferentes de *Characidium* (Figura 1): sendo 21 indivíduos (9♀/12♂) da espécie *Characidium zebra* (rio Passa Cinco, bacia do rio Alto Tietê, Ipeúna-SP), 17 (14♀/3♂) *Characidium* cf. *zebra* (nascentes do Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo rio Tietê, Poloni-SP), 29 (16♀/13♂) *Characidium* aff. *zebra* (foz do Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo rio Tietê, Poloni-SP), 8 (6♀/2♂) *Characidium pterostictum* (rio Pariquera-Açú, bacia do rio Ribeira do Iguape, Pariquera-Açú-SP), 8 (3♀/5♂) *Characidium* sp. (Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo rio Tietê, Poloni-SP), 7 (1♀/6♂) *Characidium heirmostigmata* (rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí, Prudentópolis-PR) e 18 (10♀/8♂) *Characidium gomesi* (rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa-PR). O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1; anexo 1) ou, eventualmente, a partir do banco de

preparações cromossômicas do Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 07/2011; anexo 2).

Figura 1-Destaque da região da bacia do Alto Paraná e do rio Ribeira do Iguape evidenciando os locais de coleta representados respectivamente por letras no mapa e as espécies referentes a cada local, sendo que: A, rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi/ 1-*C. gomesi*; B, rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí/ 2-*C. heirmostigmata*; C, rio Pariquera-Açú, bacia do rio Ribeira do Iguape/ 3-*C. pterostictum*; D, rio Passa Cinco, bacia do Tietê, região Piracicaba/ 4-*C. zebra*; E, Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo rio Tietê/ 5-*C.cf. zebra*, 6-*Characidium* sp.; 7-*C. aff. zebra*.



3.2 Metodologias

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada segundo a técnica de Bertollo; Takahashi e Moreira-Filho (1978) (Anexo 3). Para a detecção de heterocromatina constitutiva, a técnica de bandamento-C foi realizada segundo Sumner (1972) (Anexo 4).

Sondas W-específicas foram produzidas a partir de cromossomos W microdissectados de fêmeas da espécie *C. gomesi* (Anexo 5). Os cromossomos microdissectados foram posteriormente amplificados, utilizando-se o kit *GenomePlex® Whole Genome Amplification* (Sigma), segundo as instruções do fabricante (Anexo 6). A

sonda de 18S foi isolada a partir do DNA total de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JÚNIOR, 2004), utilizando-se os *primers* NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3' (WHITE et al., 1990) e a sonda 5S foi obtida usando os *primers* A 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (MARTINS; GALETTI JÚNIOR, 1999).

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, por meio de BioNick™ DNA Labeling System – Invitrogen e DIG-Nick Translation Mix- Roche Applied Science, seguindo as regras e concentrações determinadas pelo fabricante (Anexo 7). Para a marcação das sondas foi utilizado também a *polymerase chain reaction* - PCR- (Anexo 8), com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (por exemplo, biotina 14 dATP, Invitrogen). Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o Anexo 9.

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41. As preparações com fluorocromos/hibridação *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx41. As imagens foram capturadas com utilização do *software* DP - Controler (Olympus).

4. Resultados:

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

**4.1-Diferenciação populacional e especiação no gênero *Characidium*
(Characiformes, Crenuchidae): barreiras reprodutivas e cromossômicas**

Resumo

O gênero *Characidium* é o mais representativo dentro da subfamília Characidiinae, possui um $2n = 50$ cromossomos e é possível encontrar divergências inter-específicas e inter-populacionais. O sistema sexual presente no gênero é do tipo ZZ/ZW, com variações de tamanho, morfologia, quanto ao grau de heterocromatinização e presença ou ausência de rDNA. Inúmeras espécies de *Characidium* já estudadas mostraram cromossomos sexuais em diferentes estágios de diferenciação, em alopatria e em simpatria. Os cromossomos sexuais podem ter um papel importante na especiação se os genes para isolamento reprodutivo estiverem ligados ao sexo. O objetivo deste trabalho foi entender o mecanismo de diferenciação dos cromossomos sexuais relacionado à dinâmica das bacias hidrográficas e ao isolamento reprodutivo para a especiação no gênero *Characidium*. Todas as espécies deste gênero estudadas possuem $2n = 50$ cromossomos, com pequenas variações na fórmula cromossômica e na distribuição da heterocromatina. Através da localização dos sítios de rDNA e diferenciação dos cromossomos sexuais, foi possível estabelecer um cenário evolutivo e biogeográfico. Neste estudo é colocado o papel da diferenciação dos cromossomos sexuais para a especiação em *Characidium*, onde após a origem do sistema de cromossomos sexuais em um clado, as espécies devem ter evoluído em alopatria associada ao mecanismo de genes do isolamento reprodutivo ligados ao cromossomo Z. No estágio atual, a observação de espécies simpátricas e/ou isoladas foi decorrente da dinâmica evolutiva das bacias hidrográficas estudadas, as quais sofreram inúmeros processos de captura de cabeceiras e mistura de fauna, corroborando para a extensiva especiação neste gênero de peixes Neotropicais que apresentam pequena variação morfológica.

Population differentiation and speciation in *Characidium* genus (Characiformes, Crenuchidae: reproductive and chromosomal barriers)

Abstract

Characidium is the most representative genus in the Characidiinae subfamily, it possesses a $2n=50$ chromosomes and it is possible to find inter-specific and inter-population divergences. The sex chromosome system present in the genus is ZZ/ZW, which shows variations in size, morphology, heterochromatinization degree and rDNA presence or absence. A great number of *Characidium* species already studied showed sex chromosomes in different differentiation degree, in allopatry and sympatry. Sex chromosomes may have an important role in speciation if the reproductive isolation genes are linked to sex. The goal of this work was understanding the mechanism of sex chromosome differentiation related to the hydrographic basins dynamics and to the reproductive isolation to the speciation in *Characidium* genus. All the studied species of this genus showed $2n=50$ chromosomes, with small variations in the chromosomal formula and in the heterochromatin distribution. Through the rDNA sites location and differentiation of the sex chromosomes it was possible establish an evolutive and biogeographic scenario. In this study it is placed the sex chromosome differentiation role to the speciation in *Characidium*, where after the sex chromosome system origin in a clade, the species must have an evolution in allopatry associated to the mechanism of the reproductive isolation genes linked to the Z chromosome. In the actual stage, the observation of sympatric and/or isolated species was due to the evolutionary dynamics of the hydrographic basins studied, which suffered several processes of headwater capture and fauna mixture, corroborating to the extensive speciation in this genus of Neotropical fishes that shows little morphological variation.

Introdução

Os peixes da família Crenuchidae (Characiformes) são relativamente pequenos, com no máximo 15 cm de comprimento e pouca variação morfológica (BUCKUP, 1999). Atualmente inclui as subfamílias Crenuchinae (composta por 2 gêneros e 3 espécies) e Characidiinae (composta por 10 gêneros e 71 espécies) (FROESE; PAULY, 2013). Dentro de Characidiinae, o gênero mais representativo é *Characidium*, com 53 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2013).

As espécies desse gênero possuem $2n = 50$ cromossomos, em sua maioria são meta/submetacêntricos (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010). *Characidium* apresenta divergências inter-específicas e inter-populacionais como cromossomos supranumerários ou cromossomos B (MAISTRO et al., 1998; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011), ocorrência natural de triploidia (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011), diferenças morfológicas e de tamanho nos cromossomos sexuais quando presentes e sítios de DNAr em diferentes posições e quantidade (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003; MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010; PAZIAN et al., 2013; VICARI et al., 2008).

Ao contrário de outros vertebrados como em mamíferos, por exemplo, o sistema de cromossomos sexuais heteromórficos em peixes não é uma condição plesiomórfica, possuindo diferentes origens nos diversos gêneros e famílias, gerando sistemas simples distintos XX/XY, ZZ/ZW e sistemas múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , ZZ/ZW_1W_2 (ARTONI; BERTOLLO, 2002; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JR, 1993; OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009; SCHEMBERGER et al., 2011, entre outros).

No gênero *Characidium* as espécies *C. zebra* e *C. cf. lagosantense* são as únicas até o momento a não evidenciar heteromorfismo de cromossomos sexuais nas diferentes populações analisadas (Quadro 1). Além disto, *C. zebra* reúne características morfológicas (BUCKUP, 1993) e citogenéticas (PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011; PAZIAN et al., 2013; VICARI et al., 2008) consideradas plesiomórficas para o grupo. A pintura cromossômica comparativa com as sondas W-específica e rDNA 18S, evidenciou que o par portador da RON, semelhante ao observado em *C. zebra*, ao sofrer translocação, pode ter originado o sistema heteromórfico do tipo ZZ/ZW observado nas demais espécies, relacionado com o segundo par metacêntrico (MACHADO et al., 2011). Ainda, com a pintura

cromossômica utilizando sonda W-específica foi possível visualizar espécies com estágios iniciais de heterocromatinização e RON presente no ZW, e outras em estágios avançados de diferenciação, as quais sofreram nova translocação das RONS para os autossomos (MACHADO et al., 2011).

Os mecanismos de isolamento reprodutivo são de grande interesse na evolução (COYNE; ORR, 2004) e são características chave para o conceito biológico de espécie de Mayr. Em uma visão genética da especiação foi determinado que o isolamento reprodutivo é uma propriedade de poucos locos individuais ou regiões genômicas, e não do genoma como um todo (LEXER; WIDMER, 2008; QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009; WU, 2001). Atualmente, o papel da supressão da recombinação entre os elementos do par cromossômico sexual tem sido avaliado para a especiação (MACAYA-SANZ et al., 2011; QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). A supressão da recombinação facilita o acúmulo de genes da especiação nos cromossomos sexuais (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Este fenômeno determina uma importante função para os cromossomos sexuais na especiação manifestada pela redução da introgressão gênica e no aumento da divergência destas regiões dos genomas que divergiram recentemente (NOSIL; FUNK; ORTIZ-BARRIENTOS, 2009; QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009).

A região Neotropical tem uma enorme diversidade de espécies de peixes, a qual pode ser atribuída, em parte, ao efeito isolador das inúmeras bacias hidrográficas existentes, cada uma com um conjunto peculiar de organismos (MENEZES et al., 1990). Atividades tectônicas pretéritas associadas ao complexo sistema de falhas existentes nas principais bacias hidrográficas do Alto Paraná, São Francisco e Leste são as principais causas de diversos eventos de captura de cabeceiras, com a consequente mistura de ictiofaunas entre bacias vizinhas (CASTRO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2006; SERRA; CARVALHO; LANGEANI et al., 2007). Esta característica biogeográfica pode ter auxiliado a dispersão e a diferenciação cromossômica de espécies de *Characidium* (VICARI et al., 2008), bem como, a ocorrência de pares de espécies simpátricas e sintópicas (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003).

Deste modo, foi objetivo deste trabalho propor mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica e no isolamento reprodutivo no gênero *Characidium* por meio da citogenética clássica e molecular e das características biogeográficas associadas ao papel isolador das bacias hidrográficas neste grupo de peixes Neotropical.

Material e Métodos

Amostragem

Foram coletados indivíduos das populações/espécies *Characidium zebra* (rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê, região do alto Piracicaba, Ipeúna-SP); *Characidium* cf. *zebra* (nascentes do Córrego das Cachoeiras, baixo rio Tietê, Poloni-SP); *Characidium* aff. *zebra* (Foz do Córrego das Cachoeiras, baixo rio Tietê, Poloni-SP); *Characidium* sp. (Córrego das Cachoeiras, baixo rio Tietê, Poloni-SP); *Characidium pterostictum* (rio Pariquera-Açú, bacia do rio Ribeira do Iguape, Pariquera-Açú-SP); *Characidium heirmostigmata* (rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí, Prudentópolis-PR) e; *Characidium gomesi* (rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi, Ponta Grossa-PR).

Preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas das espécies analisadas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de “*air drying*” (BERTOLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978). Os exemplares analisados foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia), Universidade Estadual de Maringá e; Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (Processo CEUA 07/2011) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira vigente. As preparações cromossômicas foram submetidas à coloração convencional por Giemsa e Bandamento C (SUMNER, 1972) para a determinação do número diploide, fórmula cromossômica, caracterização de cromossomos sexuais e posterior utilização em ensaios de hibridação *in situ* fluorescente.

Sondas cromossômicas e de rDNA

Foram utilizadas três sondas para mapeamento destas regiões/cromossomos sobre os cromossomos das espécies de *Characidium*: a sonda do rDNA 18S, isolada a partir do DNA genômico de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI JÚNIOR, 2004), a qual foi marcada com biotina pela técnica de *nick translation*, utilizando o composto biotina 16 - dUTP (*Nick Translation Biotin* - Roche); a sonda do rDNA 5S, isolada a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JÚNIOR, 1999) marcada com digoxigenina pela técnica de *nick translation*, utilizando o composto digoxigenina 11 - dUTP

(DIG Nick Translation Mix - Roche) e; uma sonda do cromossomo W de *Characidium gomesi* (população do rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi), isolada neste trabalho pelo método de microdissecção conforme descrito em Vicari et al. (2010).

Microdissecção do cromossomo W de Characidium gomesi e amplificação do genoma total

Foram microdissectados oito cromossomos W de *Characidium gomesi* da população do rio Quebra Perna, bacia do rio Tibagi (PR). As microdissecções cromossômicas foram realizadas em microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico (Narishige). Para a microdissecção foram utilizados capilares de vidro de diâmetro de aproximadamente 0,7 µm, os quais foram preparados utilizando o “micropipette puller” (Narishige). Os cromossomos W microdissectados foram transferidos para um microtubo e utilizados no método de amplificação de genoma total “Single Cell” - Whole Genome Amplification (WGA-4 – Sigma-Aldrich) segundo as instruções do fabricante. O produto da amplificação do cromossomo W foi purificado utilizando o kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich). Posteriormente, o produto purificado foi utilizado como molde para a reamplificação, utilizando o kit Genome Plex® Whole Genome Amplification – WGA3 (Sigma-Aldrich). Na reação de amplificação WGA3 foi incorporado o nucleotídeo digoxigenina 11 dUTP na razão (7 dTTP : 3 digoxigenina 11-dUTP).

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Foram realizadas duplas FISH rDNA 18S / rDNA 5S e, rDNA 18S / sonda W-específica nos representantes do gênero *Characidium* analisados neste trabalho. O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL de cada sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10 % sulfato dextrano, pH 7,0 – 7,2, a 37 °C overnight) seguiu o procedimento geral descrito por Pinkel; Straume e Gray (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos streptavidin alexa fluor 488 (Molecular Probes) e anti digoxigenina rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).

Organização dos cariótipos

Foram analisadas cerca de 20 metáfases para cada metodologia utilizada neste trabalho e para as melhores imagens foram organizados os cariótipos. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), dependendo da sua razão de braços (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos cariótipos.

Resultados

Todas as espécies estudadas apresentaram $2n = 50$ cromossomos, com pequena variação na fórmula cariotípica, no entanto, com ampla variação quanto a presença/ausência de cromossomos sexuais heteromórficos e suas morfologias (Figuras 2 e 3), número e localização dos sítios de rDNA 18S e 5S (Figura 4) e cromossomos sexuais em diferentes estágios de diferenciação (Figura 5).

Characidium zebra

A espécie apresentou $2n = 50$ cromossomos organizados em $32m+18sm$, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 2a). A heterocromatina foi localizada preferencialmente na região pericentromérica de todos os cromossomos (Figura 2b). A dupla FISH com sondas de DNA r 5S e 18S evidenciou um único sítio de rDNA 5S no braço curto do par 17 submetacêntrico, enquanto que o rDNA 18S foi localizado na região terminal do braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 23 (Figura 4a). A pintura cromossômica com a sonda W-específica mostrou um padrão disperso em todos os cromossomos e nenhum reconhecimento de um provável par sexual (Figura 5a).

Characidium cf. zebra

Esta espécie apresentou $2n = 50$ cromossomos, $32m+18sm$ e nenhum heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 2c, 2e). O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos (Figura 2d, 2f). O rDNA 5S foi localizado no braço curto do par submetacêntrico 17 enquanto o rDNA 18S foi localizado nas regiões terminais do braço longo dos pares metacêntricos 4 e 7, e no par submetacêntrico 23 (Figura 4b). A pintura cromossômica com a sonda W-específica evidenciou marcações dispersas em todos os cromossomos (Figura 5b).

Characidium aff. zebra

Esta população apresentou número diploide de 50 cromossomos distribuídos em $32m+18sm$, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 2g, 2i). A heterocromatina foi observada na região pericentromérica de todos os cromossomos. No entanto, esta população mostrou um polimorfismo independente do sexo para blocos de heterocromatina terminais no par $sm17$ (Figura 2h, 2j). A dupla FISH com sondas de rDNA evidenciou um único sítio de rDNA 5S no braço curto do par $sm 17$ e um intenso polimorfismo para a localização e número de sítios de rDNA 18S (Figuras 4c e 5c). Sítios de rDNA 18S foram localizados em todos os indivíduos na região terminal do braço longo dos pares 2 e 23 e observados presentes ou ausentes na região terminal dos braços curto e longo do par 17, em sintonia com o rDNA 5S (Figuras 4c e 5c). Ainda, sítios adicionais puderam ser observados em alguns indivíduos da população nos pares 4, 7 e 20 (Figura 4c). A pintura cromossômica com a sonda W-específica mostrou sinais dispersos pelo cariótipo com acúmulo nas regiões terminais dos pares $m 7, 13$ e $sm 17, 19$ (Figura 5c).

Characidium pterostictum

A espécie apresentou $2n = 50$ cromossomos, com fórmula cariotípica $32m+16sm+2a$ e heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Figura 3a). Pequenos blocos de heterocromatina foram evidenciados na região pericentromérica de todos os cromossomos, nas regiões proximal e terminal do par acrocêntrico, além do cromossomo W parcialmente heterocromático (Figura 3b). Os sítios de rDNA 5S foram localizados nas regiões pericentroméricas dos pares $m 9, 11$ e 13 (Figura 4d) enquanto que a FISH com sonda de rDNA 18S evidenciou a região terminal do braço curto do cromossomo Z e o braço longo do cromossomo W marcados (Figura 4d e 5d). A pintura com sonda cromossomo W específica evidenciou localização dispersa por todos os autossomos, além de estar dispersa pelo cromossomo Z e marcando toda a extensão do cromossomo W a exceção da região do sítio de rDNA (Figura 5d).

Characidium sp.

A espécie apresentou $2n = 50$ cromossomos organizados em $32m+16sm+2a$, e um heteromorfismo de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (Figura 3c, 3e). A heterocromatina foi localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos, na região terminal de alguns pares, na região proximal do par acrocêntrico, bem como na região terminal do braço

longo do Z e no W totalmente heterocromático, exceto na região do sítio de rDNA (Figura 3d, 3f). Os sítios de rDNA 5S foram localizados nas regiões pericentroméricas dos pares m 3 e 7, sm 23 e 24 e na região terminal do par m 8 (Figura 4e). Já o sítio de rDNA 18S foi localizado na região terminal do braço longo dos cromossomos Z e W (Figuras 4e e 5e). A pintura cromossômica com a sonda W-específica marcou a banda pericentromérica do cromossomo sexual Z e toda a extensão do cromossomo W, a exceção da região do sítio de rDNA (Figura 5e).

Characidium heirmostigmata

Esta espécie apresentou $2n = 50$ cromossomos subdivididos em $32m+18sm$ e um heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Figura 3g, 3i). O bandamento C revelou pequenos blocos heterocromáticos na região pericentromérica de todos os cromossomos, além da banda proximal ao braço longo do cromossomo Z e o cromossomo W totalmente heterocromático (Figura 3h, 3j). O rDNA 5S foi localizado na região proximal do braço curto do par sm 19 enquanto que o rDNA 18S foi evidenciado na região terminal do braço longo do par metacêntrico 4 (Figura 4f e 5f). A pintura cromossômica com a sonda W-específica não evidenciou marcações em autossomos, porém marcou a região pericentromérica do cromossomo Z a totalidade do cromossomo W (Figura 5f).

Characidium gomesi

A espécie de *C. gomesi*, da população do rio Quebra Perna, utilizada neste estudo para a obtenção da sonda W-específica foi descrita citogeneticamente por Vicari et al. (2008). Esta espécie possui $2n = 50$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, onde o cromossomo Z é um médio m, e o cromossomo W é um st um pouco maior em tamanho que o Z. Desta forma, os machos apresentaram uma fórmula cariotípica de $32m + 18 sm$ e as fêmeas $31m + 18 sm + 1st$ (Figura 5g). A heterocromatina é localizada pericentromérica na maioria dos cromossomos, além do bloco proximal do braço longo do cromossomo Z e o cromossomo W totalmente heterocromático. Esta população apresenta seis sítios de rDNA 18S (Figura 5g). A sonda W-específica obtida neste estudo reconheceu a totalidade do cromossomo W, a banda proximal do cromossomo Z, além de evidenciar alguns pequenos blocos em poucos autossomos (Figura 5g).

Discussão

Variações na macroestrutura cariotípica

Neste trabalho foi realizada a primeira descrição citogenética para as espécies *Characidium* sp. e *C. heirmostigmata*, bem como, foi realizado um aprofundamento no tocante as metodologias moleculares para as demais espécies. O número diploide de 50 cromossomos foi observado em todas as espécies estudadas. Entretanto, variações na fórmula cariotípica $32m+18sm$, indicam que rearranjos cromossômicos tiveram importância na diversificação das espécies do gênero. A presença de cromossomos acrocêntricos nas espécies *C. pterostictum* e em *Characidium* sp. pode indicar a ocorrência de uma inversão pericêntrica em um par de cromossomos submetacêntricos, com o posterior acúmulo de heterocromatina, similar ao já descrito em outras populações de *C. pterostictum* (PANSONATO-ALVES et al., 2010) e para a espécie *C. lanei* (NOLETO et al., 2009).

Variações na fórmula cariotípica também foram visualizadas devido a rearranjos ocorridos durante a diferenciação dos cromossomos sexuais. São responsáveis por alterações nas fórmulas cariotípicas o cromossomo W submetacêntrico em populações diferentes de *C. gomesi* (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2011) e em *C. lanei* (NOLETO et al., 2009) e; subtelocêntrico em *C. gomesi* (MACHADO et al., 2011; VICARI et al., 2008) e *C. lauroi* (MACHADO et al., 2011).

Até o momento, apenas as espécies *C. zebra* e *C. cf. lagosantense* foram descritas por não apresentar cromossomos sexuais heteromórficos no gênero *Characidium* (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011; PAZIAN et al., 2013; SILVA; MAISTRO, 2006). *Characidium zebra* apresenta o segundo par metacêntrico, considerado possivelmente o par relacionado à origem do sistema sexual, após sofrer translocação com o cromossomo portador da RON (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011). Neste estudo, a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos foi corroborada para três diferentes populações de *C. zebra*.

A ocorrência de blocos heterocromáticos centroméricos e/ou pericentroméricos, na maioria dos autossomos, além de alguns sítios terminais é a condição comumente verificada no gênero (CENTOFANTE et al., 2003; PANSONATO-ALVES et al., 2010, 2011; PAZIAN et al., 2013; SILVA; MAISTRO, 2006). Pequenas são as variações da heterocromatina nos

autossomos de *Characidium*. Neste trabalho, as variações marcantes foram os blocos nos pares acrocêntricos de *Characidium* sp. e *C. pterostictum* evidenciando um provável papel dos DNAs repetitivos na origem da inversão cromossômica deste par. Ainda, o processo de heterocromatinização mais evidente ocorre na diferenciação do par sexual, gerando cromossomos W parcialmente ou totalmente heterocromáticos (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE et al., 2003; MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010; VICARI et al., 2008).

Localização dos sítios de DNAr 18S e 5S

As espécies de *Characidium* descritas até o momento apresentaram um único par portador de rDNA 18S e outro portador do rDNA 5S, com raras exceções para algumas populações (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011; VICARI et al., 2008). O par cromossômico sm 23, observado também neste estudo como portador da RON em *C. zebra* foi considerado um caráter plesiomórfico no gênero (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011) e esteve envolvido no mecanismo de translocação para a formação do par m 2, o qual diferenciou no sistema ZZ/ZW (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010). Deste modo, espécies com cromossomos sexuais em fase intermediária de heterocromatinização apresentam sítios de rDNA 18S nos cromossomos sexuais (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010). Neste estudo, as espécies *C. pterostictum* e *Characidium* sp. também apresentaram RONS sobre os sexuais em fase intermediária de heterocromatinização. Por sua vez, em populações/espécies onde a heterocromatinização do W é intensa, a RON sofreu nova translocação para autossomos (MACHADO et al., 2011), a exemplo das espécies *C. heirmostigmata* e *C. gomesi* estudadas neste trabalho.

Além da localização variada, as espécies/populações *C. cf. zebra*, *Characidium* aff. *zebra* e *C. gomesi* apresentaram sítios adicionais de rDNA 18S. Machado et al. (2011) propuseram que após a intensa heterocromatinização do cromossomo W a RON teria sofrido nova translocação para um par sm grande, como observado em populações de *C. alipioi* e *C. gomesi* (CENTOFANTE et al., 2003; VICARI et al., 2008). Esta condição foi observada neste estudo em *C. gomesi*, com a presença de sítios adicionais. Já as populações de *C. cf. zebra* e *C. aff. zebra* que não possuem cromossomos sexuais apresentaram o par 23 sm semelhante ao encontrado em *C. zebra* (rio Passa Cinco), além de sítios adicionais. Estes resultados reforçam

as alterações de localização da RON para espécies sem cromossomos sexuais em relação àquelas que apresentam cromossomos sexuais em fase intermediária e avançada de diferenciação.

Embora não envolvido com a diferenciação do par sexual, o rDNA 5S também apresentou uma dinâmica evolutiva para as espécies de *Characidium* estudadas. Pansonato-Alves; Oliveira e Foresti (2011) localizaram esta família gênica em cinco populações de *C. zebra* e demonstraram que nesta espécie o sítio de rDNA 5S se encontra no cromossomo sm 17, no entanto, com sítios adicionais para algumas populações. Neste estudo, para as três populações de *C. zebra* sem cromossomos sexuais heteromórficos, o sítio de rDNA 5S foi localizado sobre o par 17, enquanto para as espécies com sistemas ZZ/ZW esta família gênica foi localizada em diferentes pares, reforçando uma provável rota de diferenciação com níveis baixos ou nulos de recorrência. Ainda, *Characidium* aff. *zebra* foi a única até o momento a apresentar sítios de rDNAs 18S e 5S sintênicos no par sm 17, onde o rDNA 18S apresenta um polimorfismo estável, podendo estar presente ou ausente na região terminal de ambos braços cromossômicos.

Sítios de rDNAs múltiplos em peixes foram observados em inúmeros grupos, onde a grande maioria destes sítios podem ser considerados pseudogenes, que podem evoluir, formando uma classe de DNA satélite (FERREIRA; BERTOLLO; MARTINS, 2007; MARTINS et al., 2006; SILVA et al., 2011). A dispersão destes rDNAs nos genomas de alguns grupos de peixes demonstrou estar associada a elementos repetitivos dispersos, a exemplo do transposons Tc1-like encontrado no espaçador intergênico (ITS) da família ribossomal 5S em *Gymnotus* (SILVA et al., 2011). Em *Characidium* é provável a ocorrência de elementos repetitivos para a dispersão dos rDNAs nos genomas, contribuindo para a diversificação cariotípica e de espécies.

Diferenciação dos cromossomos sexuais

Com a utilização dos marcadores cromossômicos e a sonda do cromossomo W-específica foi possível visualizar nas espécies de *Characidium* estudadas, a ausência de heteromorfismos em três populações de *C. zebra*, enquanto em outras foram visualizados estágios diferenciados de diversificação. Em *Characidium*, a translocação da RON, a partir de um autossomo, em *C. zebra*, levou a formação do proto cromossomo sexual relacionado ao

par m 2, iniciando um processo de supressão de recombinação meiótica (para uma revisão ver MACHADO et al., 2011).

A supressão de recombinação meiótica entre o par de cromossomos homomórficos (homólogos), promoveu o início da diferenciação entre os cromossomos, que progressivamente acumulam os genes determinantes do sexo, seguido por rearranjos cromossômicos estruturais como deleções, inserções, acúmulo de elementos transponíveis e expansão de sequências repetitivas (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005). Estes mecanismos podem ter ocorrido na diversificação do par sexual de *Characidium*, onde além das diferentes morfologias dos cromossomos Z e W destaca-se o intenso acúmulo de DNAs repetitivos, como observado com a pintura cromossômica. Nas espécies sem cromossomos sexuais, há o acúmulo destes DNAs repetitivos dispersos nos autossomos, enquanto em espécies com estágios avançados de diferenciação os DNAs repetitivos estão restritos principalmente aos cromossomos sexuais. Nesta via, o entendimento da dinâmica evolutiva dos DNAs repetitivos pôde auxiliar na compreensão da diversificação dos cromossomos sexuais em *Characidium*.

Biogeografia, cromossomos sexuais, isolamento reprodutivo e especiação

O isolamento reprodutivo em organismos de reprodução sexuada é gerado por uma combinação de mecanismos de isolamento pré-zigóticos ou pós-zigóticos (MAYR, 1995). Os genes que codificam para características de isolamento sexual são mais efetivos em causar a esterilidade do híbrido quando são ligados aos cromossomos sexuais (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Nos estágios iniciais da divergência ecológica as diferenças são determinadas principalmente por genes autossômicos, mas a evolução rápida dos genes ligados ao sexo, devido à velocidade relativa de evolução, acúmulo não aleatório de mutações e de genes, exposição de genes recessivos incompatíveis em híbridos e taxa de recombinação, leva ao importante papel na evolução do isolamento sexual por codificar características com efeito de valor adaptativo sexo específico (características sexuais primárias e secundárias) – (para uma revisão ver QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009).

Este mecanismo está de acordo com o modelo de Dobzhansky–Muller para explicar as causas da infertilidade ou inviabilidade do híbrido (DOBZHANSKY, 1940; MULLER, 1940) e com a Regra de Haldane, onde o organismo híbrido do sexo heterogamético, tem seu *fitness* reduzido em relação ao híbrido homogamético. Neste caso, a inviabilidade ou

esterilidade do híbrido ocorre por alelos recessivos que apenas causarão problemas para o organismo, através de interação com outros loci, quando ligados ao X/Z e em hemizigose (para uma revisão ver QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Desta forma, é suportada a hipótese que os genes ligados ao X ou Z levariam a uma maior facilidade para a esterilidade do híbrido e inviabilidade nas fases posteriores da especiação em relação aos autossomos (BEGUN; WHITLEY, 2000; BETANCOURT; PRESGRAVES; SWANSON, 2002; MASLY; PRESGRAVES, 2007; QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009; TAO et al., 2003; THORNTON; BACHTROG; ANDOLFATTO, 2006; TRUE; WEIR; LAURIE, 1996).

A presença de espécies de *Characidium* vivendo em um mesmo ambiente, com sistemas de cromossomos sexuais em diferentes níveis evolutivos, sugere a possibilidade da ocorrência de diferenciação dos cromossomos sexuais e especiação no gênero em simpatria. A especiação em simpatria ocorre devido à diferenciação ecológica e isolamento sexual, que precedem as incompatibilidades gênicas intrínsecas (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Em simpatria, o isolamento reprodutivo é causado por um isolamento reprodutivo pré-zigótico, devido primeiramente à uma diferenciação ecológica, que pode levar a uma redução na probabilidade de encontro (espacial ou temporal), acasalamento (isolamento sexual) ou sucesso da fertilização (devido, por exemplo, a incompatibilidades entre o espermatozóide e o ovo) (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009).

Entretanto, Vicari et al. (2008) descreveram que a diferenciação dos cromossomos sexuais está associada à dinâmica evolutiva das bacias hidrográficas e especiação em alopatria no gênero *Characidium*. Neste caso, somente após a diferenciação do par proto sexual em um clado de *Characidium* teriam ocorrido eventos de vicariância. Tais barreiras impediram o fluxo gênico entre as espécies, promovendo a evolução independente do sistema de cromossomos sexuais, em consequência de tal translocação, permitindo a divergência em relação aos cromossomos sexuais e especiação em alopatria. Para as bacias hidrográficas do rio São Francisco, complexo das bacias litorâneas brasileiras e bacia do Alto rio Paraná (Figura 6) já foram estudadas espécies de *Characidium* e inúmeras populações com divergências consistentes em relação à diferenciação dos cromossomos sexuais (Quadro 1).

Alguns rios de terras altas do escudo cristalino do sul-sudeste do Brasil mostram um intercâmbio de faunas (RIBEIRO, 2006) devido às atividades tectônicas pelas quais tem passado desde o início do Terciário (AB'SABER, 1998). Essas áreas que correspondem às

regiões do Alto rio Paraná, bacias litorâneas e também as cabeceiras da bacia do rio São Francisco apresentam características geológicas interessantes, onde um complexo sistema de falhas e movimentos verticais de blocos impôs uma aceleração do dinamismo fluvial, com consequentes eventos de capturas de cabeceiras de rios e intercâmbio de faunas (ARTONI et al., 2009; BRITSKI; SATO; ROSA, 1986; BRITTO; CASTRO, 2002; CASTRO et al., 2003; LANGEANI, 1989; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2006; SERRA; CARVALHO; LANGEANI et al., 2007; WEITZMAN; MALABARBA, 1999).

No gênero *Characidium* foram estudadas até o momento 14 espécies e cerca de 30 populações que habitam estas áreas (Quadro 1, Figura 6). Destas, em duas espécies os sistemas de cromossomos sexuais foram ausentes: *C. zebra* (inúmeras populações) e *C. lagosantense* (MACHADO et al., 2011; PAZIAN et al., 2013). *Characidium zebra* é encontrado na maioria das populações em simpatria e sintopia com *C. gomesi* (portadora de heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW) sem nenhuma evidência de formação de híbridos (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; VICARI et al., 2008). As diferentes populações de *C. gomesi* estão amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas do alto Paraná e São Francisco e apresentam cromossomos sexuais em estágios diferentes de diferenciação (Quadro 1). Porém, estes cromossomos sexuais sempre estão altamente heteromórficos e são fortes as evidências da barreira reprodutiva como consequência dos cromossomos sexuais com morfologias diferentes nesta espécie (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2011; PAZIAN et al., 2013; VICARI et al., 2008; Presente estudo).

Outro caso interessante é o par de espécies simpátrico e sintópico *C. alipioi* e *C. lauroi* (Quadro 1) da bacia litorânea do Paraíba do Sul (CENTOFANTE et al., 2003). *Characidium alipioi* apresenta cromossomos sexuais em estágio avançado de heterocromatinização (CENTOFANTE et al., 2003), enquanto posteriormente a espécie *C. lauroi* foi descrita com pintura cromossômica da sonda W-específica por apresentar um par ZZ/ZW em fase inicial de diferenciação e pouca heterocromatina (MACHADO et al., 2011). Foi considerado que estas espécies divergiram em alopatria e eventos de capturas de cabeceiras de rios tornaram as espécies simpátricas (CENTOFANTE et al., 2003). Também espécies de outras bacias litorâneas apresentam cromossomos sexuais heteromórficos: *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. oiticicai* e *Characidium* sp. (NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2011; Presente estudo; Quadro 1), algumas destas visualizadas em simpatria. A

bacia litorânea é formada por um grande número de bacias hidrográficas independentes, aliada ao efeito isolador que as cadeias de montanhas que separam os diversos vales da região exercem sobre as várias populações de peixes (BUCKUP, 1991). As características topográficas e fisionômicas proporcionam uma ampla gama de ambientes distintos, o que favorece a ocorrência de um grande número de espécies, cada uma das quais adaptadas a um subconjunto particular destes ambientes, o que eleva o número de espécies endêmicas na área (BUCKUP, 1991). Ainda, a predominância de cursos d'água relativamente pequenos favorece a ocorrência de espécies de pequeno porte, com limitado potencial de dispersão espacial e tendências de fixação de divergências genéticas interpopulacionais. Deste modo, é provável que a ocorrência de genes para formação de caracteres sexuais e isolamento reprodutivo possa estar presente nos cromossomos sexuais, mantendo estas espécies sem formação de híbridos em *Characidium*.

Por sua vez as espécies *C. shubarti*, *C. heirmostigmata*, *Characidium* sp. e várias populações de *C. gomesi* são características de ambiente de cabeceiras de rios da bacia do alto rio Paraná (Figura 6), e devido ao pequeno potencial de dispersão, isoladas umas das outras em fluxo gênico. Esta especiação em regiões isoladas de cabeceiras de rios tem sido marcante para as espécies *C. shubarti*, *C. heirmostigmata*, *Characidium* sp., as quais são encontradas apenas em suas respectivas regiões. Entretanto, *C. gomesi* apresenta uma maior área de distribuição, mas com diferenças interpopulacionais marcantes na morfologia do par ZW e no número de sítios de rDNA, as quais, possivelmente podem ser interpretadas como barreiras reprodutivas; entretanto, esta diferenciação genética ainda não é acompanhada da diferenciação morfológica para a descrição de taxa independentes.

Além disto, a diferenciação cariotípica visualizada em *Characidium* pode contribuir para o estabelecimento de barreiras meióticas. Os rearranjos cromossômicos atuam como barreiras para o fluxo gênico uma vez que formas cromossômicas diferenciadas apresentam potencial para a formação de híbridos; entretanto, os rearranjos cromossômicos agem na segregação meiótica como barreiras reprodutivas pós-zigóticas (BAKER; BICKHAM 1986; CAPANNA, 1982; KING, 1981; KING, 1993; SHAW, 1981; WHITE, 1978). Este modelo de isolamento reprodutivo pode ser utilizado para explicar a especiação em *Characidium*. Dentro desta proposta, populações deste gênero previamente isoladas ou de cabeceiras de rios tenderiam a acumular divergências genéticas e estabelecer mecanismos de isolamento

reprodutivo mais facilmente em locos ligados ao cromossomo Z, ou relacionados às barreiras meióticas, mantendo a unidade biológica mesmo se o contato entre as espécies for restaurado.

Este estudo propõe que a especiação em *Characidium* ocorreu como consequência do isolamento geográfico em cabeceiras de rios entre linhagens ancestrais sem sistema de cromossomo sexual e outra com a presença de proto cromossomos sexuais. A diferenciação populacional em diferentes bacias hidrográficas da região Neotropical levou a observação das espécies atuais, sem cromossomos sexuais e com cromossomos em diferentes estágios de diversificação. Nesta hipótese, durante a diferenciação dos cromossomos sexuais podem ter se estabelecido mecanismos de isolamento reprodutivo consistentes em locos ligados ao Z e as barreiras meióticas associadas a diferenciação cariotípica, os quais não poderiam ser quebrados mesmo se o fluxo gênico entre elas fosse restabelecido.

Quadro 1- Relação de espécies/populações de *Characidium* estudadas quanto à variação da fórmula cariotípica; presença ou ausência, e morfologia do sistema de cromossomos sexuais; localização e número de sítios de rDNA

Espécie	Local de Coleta	NM	FC	Cromossomos sexuais	Presença de sítios de DNAr	Ref
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Paiol Grande, Bacia do Rio Sapucaí, São Bento do Sapucaí-SP	1	32M+18SM	Ausente	RON/intersticial/braço longo/par 23	4
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Machado, Bacia do Rio Sapucaí, próximo de São João da Mata-MG	2	32M+18SM	Ausente	RON/subterminal/braço longo/par 23/ submetacêntrico	5
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Paraitinga, Bacia do Alto Tietê, Salesópolis-SP	3	32M+18SM	Ausente	RON/terminal/par 23	7
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Paraitinga, Bacia do Alto Tietê, Salesópolis-SP	3	32M+18SM	Ausente	18S/intersticial/braço longo/par 23; 5S / intersticial/pares 1 e 6 e um homólogo do par 17	8
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Alambari, Bacia do Médio Tietê, Botucatu-SP	4	32M+18SM	Ausente	18S/intersticial/braço longo/par 23; 5S / intersticial/par 17	8
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Novo, Bacia do Médio Paranapanema, Avaré-SP	5	32M+18SM	Ausente	18S/intersticial/braço longo/par 23; 5S / intersticial/par 17	8
<i>Characidium cf. zebra</i>	Rio Juba, Bacia Rio Paraná, Nova Fernandópolis-MT	6	32M+18SM	Ausente	18S/intersticial/braço longo/par 23; 5S / intersticial/pares 1,6, 9, 17 e 18	8
<i>Characidium zebra</i>	Rio Passa Cinco, Bacia do Rio Piracicaba, Ipeúna-SP	7	32M+18SM	Ausente	18S/subterminal/braço longo/par 23/ submetacêntrico	9 e PE
<i>Characidium zebra</i>	Rio Passa Cinco, Bacia do Rio Piracicaba, Ipeúna-SP	7	32M+18SM	Ausente	18S/terminal/braço longo/par 23/ submetacêntrico; 5S /braço curto/par 17/ submetacêntrico	PE
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego Ribeirão Claro, Bacia do Rio Tietê, Rio Claro-SP.	8	32M+18SM	Ausente	Não disponível	10
<i>Characidium cf. zebra</i>	Córrego das Cachoeiras, Bacia do Baixo rio Tietê, Poloni-SP	9	32M+18SM	Ausente	18S/terminal/pares metacêntricos 4 e 7/ par 23 submetacêntrico; 5S / par 17/ braço curto/ submetacêntrico	PE
<i>Characidium aff. zebra</i>	Córrego das Cachoeiras, Bacia do Baixo rio Tietê, Poloni-SP	10	32M+18SM	Ausente	18S / terminal / pares 2 e 23; 18S / presente ou ausente/ terminal/braços curto e longo/par 17/sintenia 5S; 18S/sítios variáveis/pares 4, 7 e 20;	PE

					5S/submetacêntrico/par 17	
<i>Characidium</i> cf. <i>lagosantense</i>	Córrego Amendoim, Bacia do Rio das Velhas, Curvelo-MG	11	32M+18SM	Ausente	Não disponível	10
<i>Characidium</i> cf. <i>fasciatum</i>	Córrego do Rio das Velhas, Bacia do Rio São Francisco, Curvelo-MG	12	32M+18SM	ZZ/ZW	Não disponível	10
<i>Characidium lauroi</i>	Tributário do Rio Grande, Bacia Litorânea, Ubatuba-SP	13	32M+18SM	ZZ/ZW	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium lauroi</i>	Córrego Grande, Bacia do Paraíba do Sul-SP	14	31M+18SM+1ST♀ 32M+18SM♂	ZZ/ZW(Z-M; W-ST)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	9
<i>Characidium pterostictum</i>	Rio Betari, Bacia do Rio Betari, Apiaí-SP	15	32M+16SM+2A	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium pterosticum</i>	Rio Pariquera-Açú, Bacia do Rio Ribeira do Iguape, Pariquera-Açú-SP	16	32M+16SM+2A	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W; 5S/pericentromérico/pares 9, 11 e 13/ metacêntrico	PE
<i>Characidium</i> sp.	Córrego das Cachoeiras, Bacia do Baixo rio Tietê, Poloni-SP	17	32M+16SM+2A	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braços longos do ZW; 5S/pericentromérico/ pares 3 e 7/ terminal/par 8/metacêntrico/pares 23 e 24 /pericentromérico/submetacêntrico	PE
<i>Characidium oiticicai</i>	Rio Paraitinga, Bacia do Alto Tietê, Salesópolis-SP	18	32M+18SM♂ 31M+19SM♀	ZZ/ZW(Z-M; W-SM)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium lanei</i>	Rio Barroca, Bacia do Atlântico-PR	19	32M+16SM+2A	ZZ/ZW(Z-M; W-SM)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W; 5S/pericentromério / braço curto/ submetacêntrico não identificado	1
<i>Characidium lanei</i>	Córrego Cari, Morretes-PR	20	32M+18SM♂ 31M+19SM♀	ZZ/ZW(Z-M; W-SM)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium</i> sp.	Tributário do rio Preto, Bacia do Rio Preto, Itanhaém-SP	21	32M+18SM	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium schubarti</i>	Rio Cinco Réis, Bacia do Rio Jaguariaíva, Jaguariaíva-PR	22	32M+18SM	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço curto do Z/braço longo do W	7
<i>Characidium</i> sp.	Rio Formoso, Bacia do Alto Rio Paraná, Chapadão do Céu-GO	23	32M+18SM	ZZ/ZW	Não disponível	10
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	Córrego Alambari, Bacia do Rio Tietê, Botucatu-SP	4	31M+19SM♀ 32M+18SM♂	ZZ/ZW(Z-M; W-SM)	18S/terminal/braço longo/Z e W; 5S / pericentromérico/pares 20 e 25	3
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Alambari, Bacia do Rio	4	32M+18SM	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço longo/Z e W/E	9

	Tietê–Botucatu-SP				terminal/apenas um homólogo do par 19 em machos	
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	Córrego Rio da Cachoeira, Bacia do Alto Rio Paraná, Itumirin-GO	24	32M+18SM	ZZ/ZW	Não disponível	10
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	Rio Novo, Bacia do Rio Paranapanema (Médio), Avaré-SP	25	31M+19SM♀ 32M+18SM♂	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/par 18/ submetacêntrico 5S/par 25	3
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Paiol Grande, Bacia do Rio Sapucaí, São Bento de Sapucaí-SP	1	31M+19SM♀ 32M+18SM♂	ZZ/ZW(Z-M; W-SM)	18S/terminal/braço longo/par 18	4
<i>Characidium gomesi</i>	Rio Machado, Bacia do Rio Sapucaí, São João da Mata- MG	26	32M+18SM	Ausente	18S/submetacêntrico 17	5
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	Rio Quebra Perna, Bacia do Rio Tibagi, Ponta Grossa-PR	27	32M+18SM♂ 31M+18SM+1ST♀	ZZ/ZW(Z-M; W-ST)	18S/10 sítios/teloméricos/braços longos ou curtos; 5S /pericentromérico/ braço curto/ metacêntrico	6
<i>Characidium gomesi</i>	Córrego Minhoca, Bacia do Rio São Francisco-MG	28	32M+18SM	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/par 17	9
<i>Characidium gomesi</i>	Rio Verde, Bacia do Rio Tibagi, Ponta Grossa-PR	29	♂32M+18SM ♀31M+18SM+1ST	ZZ/ZW(Z-M; W-ST)	18S/terminal/pares 17 e 22/terminal/um homólogo dos pares 1 e 20	9
<i>Characidium</i> sp. cf. <i>C. alipioi</i>	Córrego Ribeirão Grande, Bacia do Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-SP	30	30M+20SM	ZZ/ZW(M)	RON/distal/braço longo /par 16	2
<i>Characidium heirmostigmata</i>	Rio Barra Grande, Bacia do Rio Ivaí, Prudentópolis-PR	31	32M+18SM	ZZ/ZW(M)	18S/terminal/braço longo/metacêntrico/ par 4; 5S / braço curto/par 19/submetacêntrico	PE

Nota:NV: Não visível no mapa. FC:Fórmula Cariotípica. NM: Numeração referente à localização da população, indicada na figura 6. Rf: Referências: 1- NOLETO et al., 2009; 2-CENTOFANTE et al., 2003; 3-PANSONATO-ALVES et al., 2011; 4-CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; 5-SILVA; MAISTRO, 2006; 6-VICARI et al., 2008; 7-PANSONATO-ALVES et al., 2010; 8-PANSONATO-ALVES; OLIVEIRA; FORESTI, 2011; 9-MACHADO et al., 2011; 10- PAZIAN et al., 2013; PE: Presente Estudo.

Figura 2. Cariótipos das populações de *Characidium zebra*, sem heteromorfismos de cromossomos sexuais. *C. zebra* do rio Passa-Cinco, bacia do Piracicaba e Tietê (a) em coloração convencional por Giemsa e (b) bandamento C sequencial; *C. cf. zebra* das nascentes do córrego das cachoeiras, bacia do baixo Tietê (c, e) em coloração convencional por Giemsa e (d, f) bandamento C sequencial; *C. aff. zebra* da foz do córrego das cachoeiras, bacia do baixo Tietê (g, i) em coloração convencional por Giemsa e (h, j) bandamento C sequencial. Barra = 10 µm.

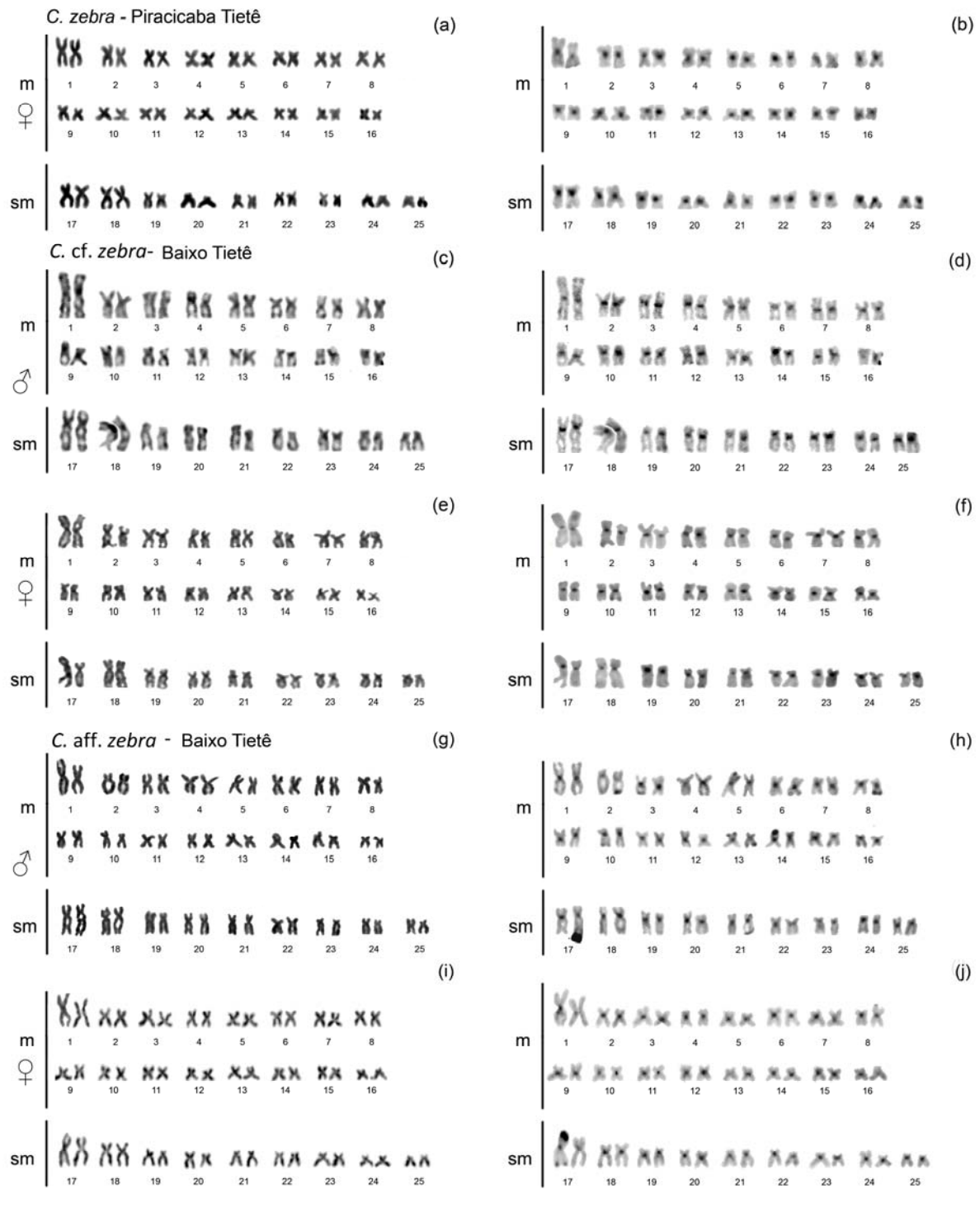


Figura 3. Cariótipos das espécies de *Characidium* com heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW. *C. pterostictum* do rio Pariquera-Açu, bacia do Ribeira do Iguape (a) em coloração convencional por Giemsa e (b) bandamento C seqüencial; *Characidium* sp. do Córrego das Cachoeiras, bacia do baixo Tiê (c, e) em coloração convencional por Giemsa e (d, f) bandamento C seqüencial; *C. heirmostigmata* do rio Barra Grande, bacia do Ivaí (g, i) em coloração convencional por Giemsa e (h, j) bandamento C seqüencial. Barra = 10 µm.

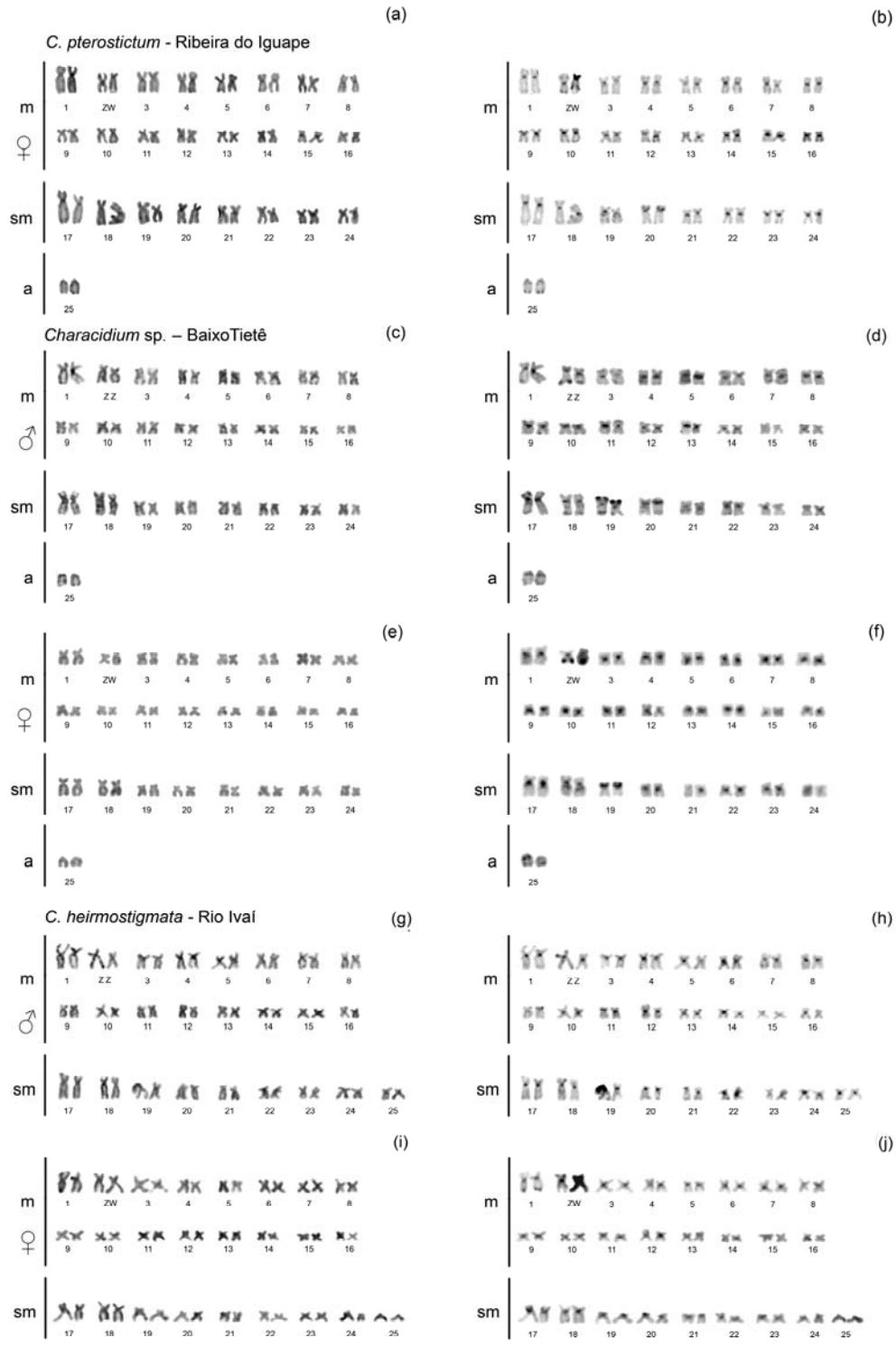


Figura 4. Cariótipos das espécies de *Characidium* submetidos a dupla FISH com sonda de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Em (a) *C. zebra*; (b) *C. cf. zebra*; (c) *C. aff. zebra*; (d) *C. pterostictum*; (e) *Characidium* sp. e; (f) *C. heirmostigmata*. Barra = 10 μ m.

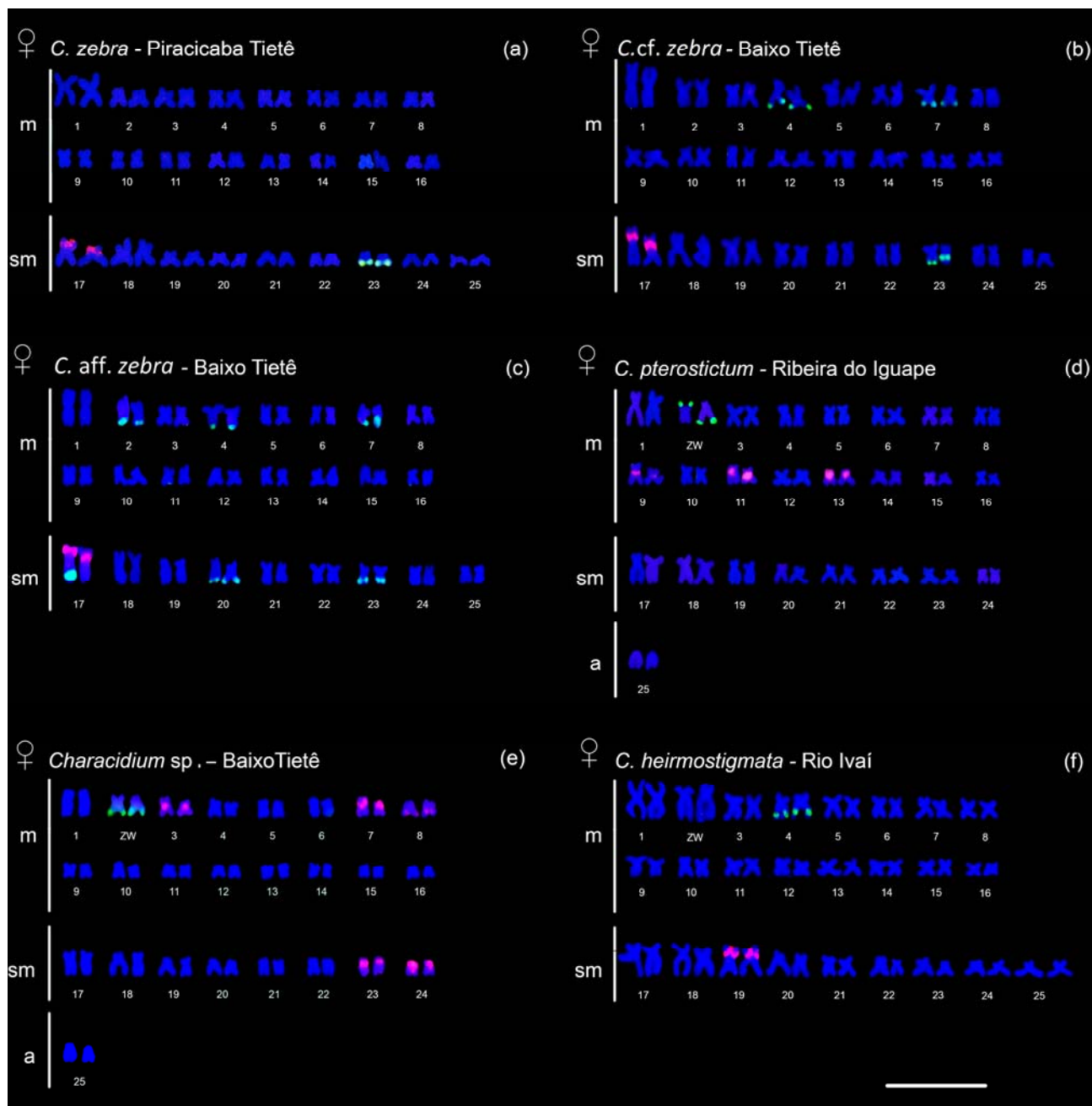


Figura 5. Cariótipos das espécies de *Characidium* submetidos a dupla FISH com sonda de rDNA 18S (verde) e sonda W-específica (vermelho). Em (a) *C. zebra*; (b) *C. cf. zebra*; (c) *C. aff. zebra*; (d) *C. pterostictum*; (e) *Characidium* sp.; (f) *C. heirmostigmata* e; (g) *C. gomesi*. Barra = 10 μ m.

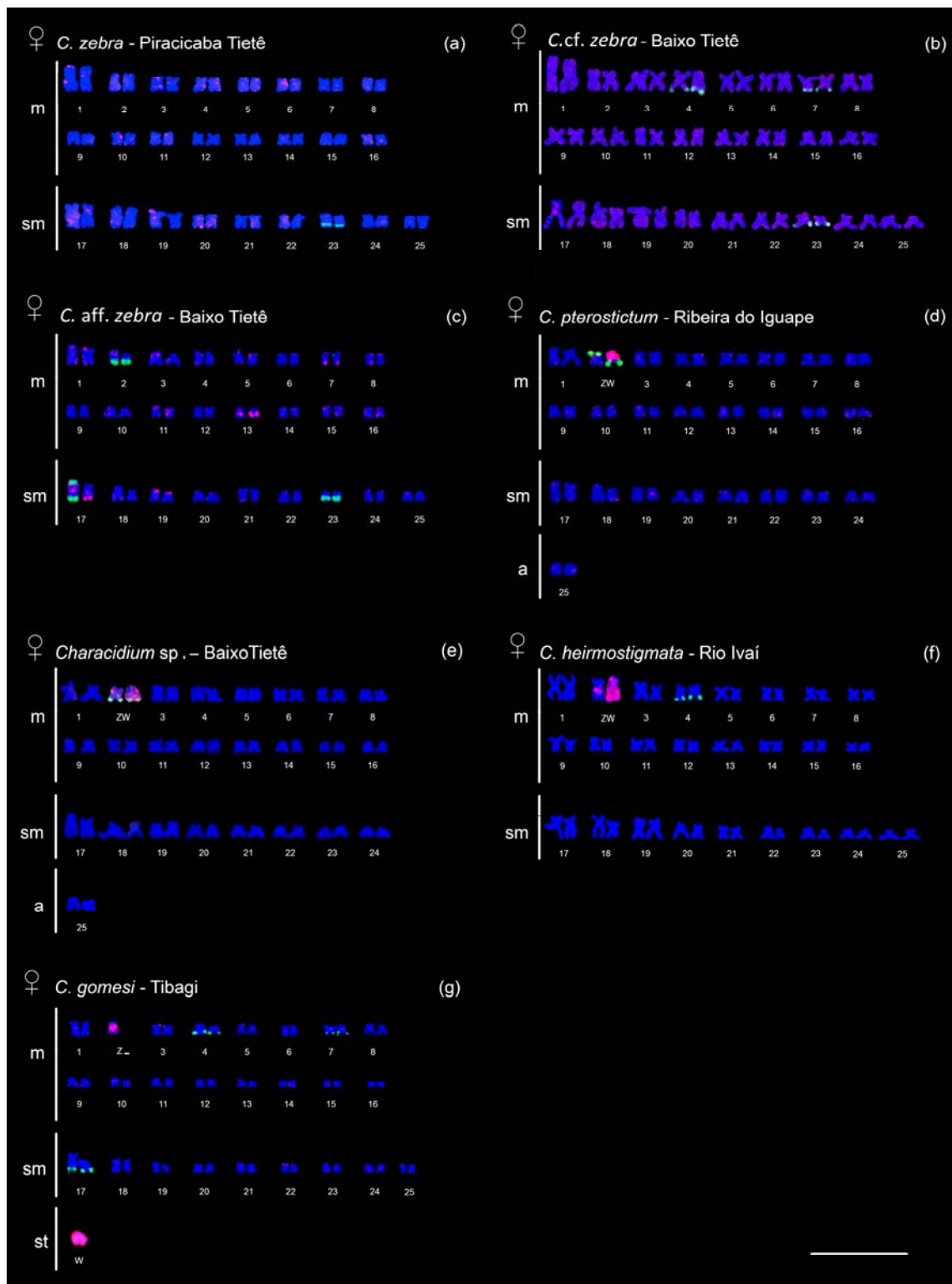
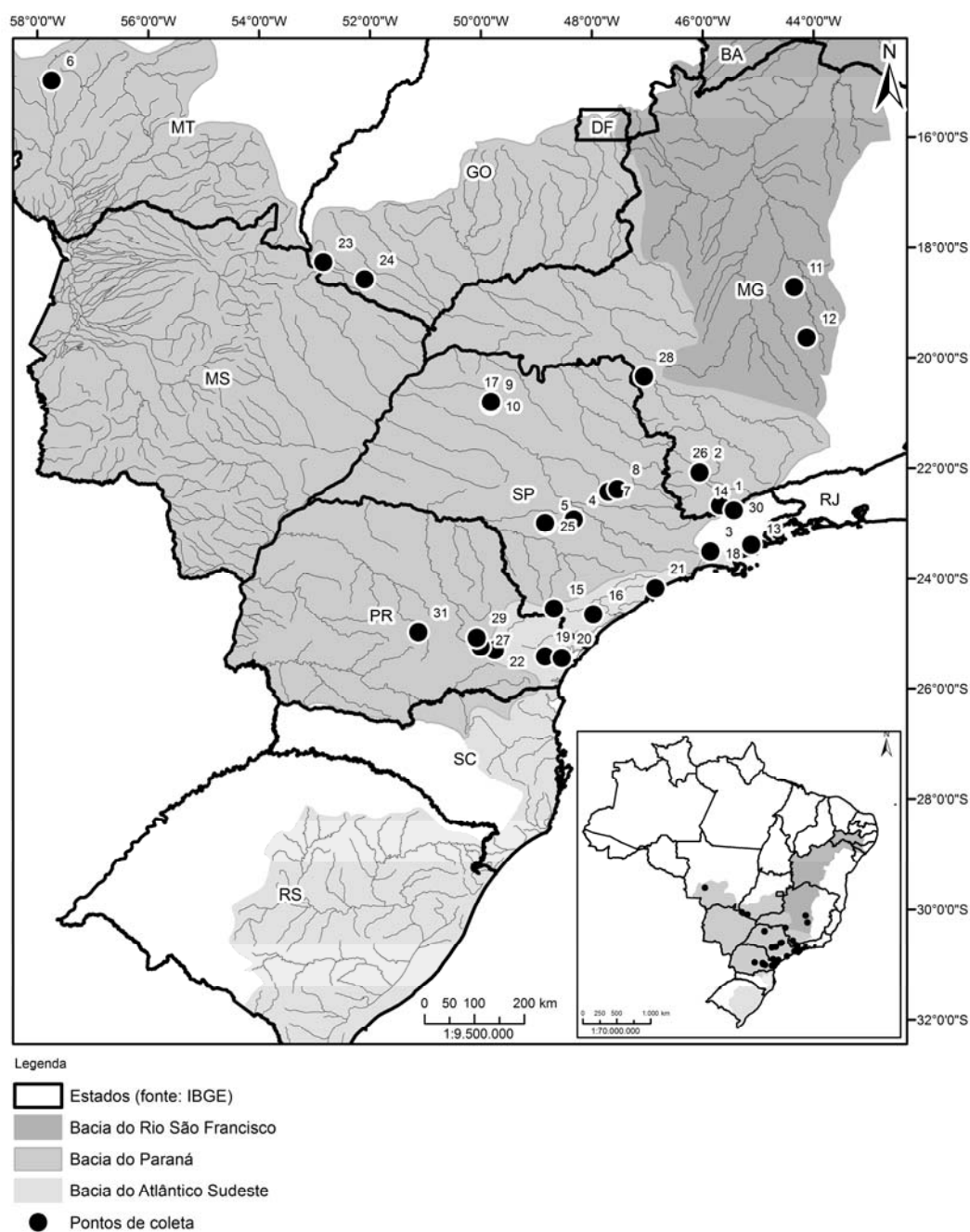


Figura 6-Mapa da América do Sul com destaque para as bacias hidrográficas do Alto Paraná, São Francisco e Litorânea. Os locais de coleta foram representados por números no mapa, sendo que a população referente ao local indicado no mapa, é identificada pelo respectivo número, na coluna NM, presente no Quadro 1.



5.Considerações finais

O gênero *Characidium* possui um número diploide mais frequente igual a 50 cromossomos, inclusive nas espécies descritas pela primeira vez *Characidium* sp. e *C. heirmostigmata*. Entretanto, alterações nas fórmulas cariotípicas presentes nas espécies *C. pterostictum* e em *Characidium* sp. (32m+16sm+2a) indicam que rearranjos estruturais, como inversões, podem ter sido importantes para variações no gênero. Alterações nestas fórmulas cariotípicas, também podem ser devido a rearranjos envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2001; MACHADO et al., 2011; NOLETO et al., 2009; PANSONATO-ALVES et al., 2011; VICARI et al., 2008). *Characidium gomesi*, da população do rio Quebra Perna representa este fato com a presença de seu cromossomo W subtelocêntrico.

O sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW comum em *Characidium* está presente na maioria das espécies estudadas até o momento, porém em níveis variáveis de diferenciação e grau de heterocromatinização. As espécies/populações de *C. zebra* e *C. cf. lagosantense* foram as únicas até o momento, onde um sistema de cromossomo sexual heteromórfico está ausente (PAZIAN et al., 2013). Naquelas onde o sistema de cromossomo sexual ocorre, a presença do cromossomo W total ou parcialmente heterocromático torna evidente a importância do processo de heterocromatinização na diferenciação deste cromossomo.

A evolução dos cromossomos sexuais mostrou possível envolvimento com a localização dos sítios de rDNA 18S. O par cromossômico sm 23, observado como portador da RON em *C. zebra* foi considerado um caráter plesiomórfico no gênero e esteve envolvido no mecanismo de translocação para a formação do par m 2, o qual diferenciou no sistema ZZ/ZW (MACHADO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2010). Após esta translocação o processo de diferenciação do sistema ZZ/ZW ocorreu principalmente por heterocromatinização. Desta maneira, as espécies com cromossomos sexuais em fase intermediária de heterocromatinização apresentam sítios de rDNA 18S sobre os cromossomos sexuais, como em *C. pterostictum* e *Characidium* sp. Com o intenso processo de heterocromatinização, a RON sofreu uma nova translocação para autossomos (MACHADO et al., 2011), a exemplo das espécies *C. heirmostigmata* e *C. gomesi*. O novo processo de translocação, também pode estar associado à presença de sítios adicionais de rDNA.

A evolução de um cromossomo autossômico a um cromossomo sexual heteromórfico (ZZ/ZW ou XX/XY) é iniciada com uma mutação levando a heterozigose a um dos sexos e mantendo a homozigose no outro, dando origem aos proto cromossomos sexuais. Além desta, outras mutações vantajosas ocorreram apenas no sexo heteromórfico, sendo deletérias no sexo homomórfico. O acúmulo de genes determinantes do sexo no cromossomo heteromórfico ocorreu como consequência de supressão da recombinação meiótica entre o par antigamente homólogo. Em seguida, rearranjos cromossômicos como deleções, inserções, acúmulo de elementos transponíveis e expansão de sequências repetitivas levaram à diversificação do par sexual (MATSUBARA et al., 2006; MULLER, 1964; STEINEMANN; STEINEMANN, 2005).

O acúmulo de genes ligados ao sexo, determinando características sexuais primárias e secundárias, origina características com efeito de valor adaptativo sexo específico, possuindo assim importância na evolução do isolamento sexual. Apesar das extensas diferenças genéticas interpopulacionais, como na morfologia do par ZW e no número de sítios de rDNA, a diferenciação morfológica não é uma característica marcante entre as espécies do gênero. Sendo assim, as diferenças genéticas existentes podem ser interpretadas como sendo as barreiras reprodutivas.

A explicação para a especiação no gênero, mesmo para as espécies vivendo em simpatria, considera que após o surgimento do proto par sexual de *Characidium* as populações sofreram eventos de vicariância e, quando isoladas teriam acumulado divergências genéticas e mecanismos de isolamento reprodutivo, representados pela evolução do par sexual ZZ/ZW. Estas espécies divergiram em alopatria e posteriores eventos de capturas de cabeceiras de rios tornaram as espécies simpátricas. O acúmulo de genes ligados ao sexo e barreiras meióticas associadas à diferenciação cariotípica, promoveram um isolamento reprodutivo, que permaneceria mesmo se o isolamento geográfico fosse perdido e o contato entre estas espécies/populações fosse restabelecido.

6. Referências bibliográficas:

AB'SABER, N. A. Megageomorfologia do território brasileiro. In: CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T. (Eds.). **Geomorfologia do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertand Brasil, 1998, p. 71-106.

ARENS, Y. H. J. M. et al. Familial insertion (3,5) (q25.3; q22.1q31.3) with deletion or duplication of chromosome region 5q22.1-5q31.3 in ten unbalanced carriers. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 130A, p. 128-133, 2004.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, Edimburgo, v.89, p. 15-19, 2002.

ARTONI, R. F. et al. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. **Review in Fish Biology and Fisheries**, Netherlands, v. 19, p. 393-401, 2009.

BAKER, R. J.; BICKHAM, J. W. Speciation by monobrachial centric fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, p. 8245-8248, 1986.

BATES, G. P. et al. Microdissection e microcloning from the short arm of human chromosome. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 6, n. 11, p. 3826-3830, 1986.

BEGUN, D. J.; WHITLEY, P. Reduced X-linked nucleotide polymorphism in *Drosophila simulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 5960-5965, 2000.

BEKLEMISHEVA, V. R. et al. Reconstruction of karyotype evolution in core Glires. I. The genome homology revealed by comparative chromosome painting. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 549-565, 2011.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.

BETANCOURT, A. J.; PRESGRAVES, D. C.; SWANSON, W. J. A test for faster X evolution in *Drosophila*. **Molecular and Biology Evolution**, Chicago, v. 19, p. 1816-1819, 2002.

BILTUEVA, L. et al. Karyotype evolution of Eulipotyphla (Insectivora): The genome homology of seven *Sorex* species revealed by comparative chromosome painting and banding data. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 135, n. 1, p. 51-64, 2011.

BIZERRIL, C. R. S. F. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 16, n. 1, p. 51-80, 1994.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 2. ed. Brasília: CODEVASF, 1986. 115 p.

BRITTO, M. R.; CASTRO, R. M. C. New Corydoradine catfish (Siluriformes: Callichthyidae) from the upper Paraná and São Francisco: the sister group of *Brochis* and most of *Corydoras* species. **Copeia**, Washington, v. 4, p. 1006-1015, 2002.

BUCKUP, P. A. **The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes**. 1991. 391f. Tese. The University of Michigan, Michigan, 1991.

BUCKUP, P. A. Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi). **Cladistics**, New York, v. 9, p. 305-341, 1993.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 123-144.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 1999. p. 91-138.

BULL, J. J. Sex Determination in Reptiles. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 3-21, 1980.

CAPANNA, E. Robertsonian numerical variation in animal speciation: *Mus musculus*, an emblematic model. In: BARIGOZZI, C. (Ed.) **Mechanisms of speciation**. New York: Liss, 1982. p. 155-177.

CASTRO, R. M. C. et al. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2003.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, Florence, v. 54, n. 3, p. 253-260, 2001.

CENTOFANTE, L. et al. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, Landskrona, v. 138, p. 213-218, 2003.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, Edinburgh, v. 95, p. 118-128, 2005.

CHEN, N. et al. Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing. **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 183, p. 2-9, 2012.

CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. **Methods in Cell Science**, Dordrecht, v. 23, p. 37-55, 2001.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. **Speciation**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 2004. 545p.

DESTEFANI, E. V. **Regime Hidrológico do Rio Ivaí-PR**. 2005, 95f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2005.

DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triporthus* fish species (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2009.

DOBZHANSKY, T. Speciation as a stage in evolutionary divergence. **The American Naturalist**, Chicago, v. 74, p. 312-321, 1940.

EGGERT, C. Sex determination: the amphibian models. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 44, p. 539-549, 2004.

FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, n. 12, p. 950-962, 2007.

FERREIRA, I. A.; BERTOLLO, L. A. C.; MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S *Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fish (Characiformes) with emphasis on *Hoplias malabaricus* "species complex". **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 118, n. 1, p. 78-83, 2007.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: < www.fishbase.org >. Acesso em: 10 mar. 2013.

FUKOVÁ, I. et al. Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, Berlin, v. 116, n. 2, p. 135-145, 2007.

GALIÁN, J.; HOGAN, J. E.; VOGLER, A. P. The Origin of Multiple Sex Chromosomes in Tiger Beetles. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 1792-1796, 2002.

GOLL, L. G. et al. Cytogenetic analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the mechanism of association of the Xyp sex chromosomes. **Cytogenetic Genome Research**, New York, v. 139, p. 29-35, 2013.

GRAÇA, W. J. da; PAVANELLI, C. S. *Characidium heirmostigmata*, a new characidiin fish (Characiformes: Crenuchidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 53-56, 2008.

GREEN, D. M. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, Ottawa, v. 33, n. 6, p. 818-824, 1990.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 154 p.

HATANAKA, T.; GALETTI JÚNIOR, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, The Hague, v. 122, p. 239-244, 2004.

HIRAI, H.; HIRAI, Y.; LOVERDE, P. T. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 61, p. 684-689, 2012.

HOLMQUIST, G. P.; ASHLEY, T. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 114, p. 96-125, 2006.

KING, M. Chromosome change and speciation in lizards. In: ACHLEY, W. R.; WOODRUFF, D. (Eds.) **Evolution and speciation**. London: Cambridge University Press, 1981. p. 262-285.

KING, M. **Species Evolution. The role of chromosome change**. London: Cambridge University Press, 1993. 336 p.

KONDO, M. et al. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of Medaka from other fish species. **Current Biology**, London, v. 13, p. 416-420, 2003.

LANGEANI, F. **Ictiofauna do Alto Curso do rio Tietê (SP): taxonomia**. 1989, 231 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Zoologia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

LANGEANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 7, n. 3, p. 181-197, 2007.

LEITÃO, R. P.; CARAMASCHI, E. P.; ZUANON, J. Following food clouds: feeding association between a minute Loricariid and a Characidiin species in an atlantic forest stream, Southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 5, n. 3, p. 307-310, 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, p. 201-220, 1964.

LEXER, C.; WIDMER, A. The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, United Kingdom, v. 363, p. 3023-3036, 2008.

LUKHTANOV, V. A. Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Germany, v. 38, n. 2, p. 73-79, 2000.

MACAYA-SANZ, D. et al. Genetic analysis of post-mating reproductive barriers in hybridizing European *Populus* species. **Heredity**, Edimburgo, v. 107, p. 478-486, 2011.

MACHADO, T. C. et al. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**, London, v. 12, n. 65, p. 1-8, 2011.

MAHJOUBI, F.; HILL, R. J.; PETERS, G. B. Chromosome microdissection identifies genomic amplifications associated with drug resistance in a leukemia cell line: an approach to understanding drug resistance in cancer. **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 263-276, 2006.

MAISTRO, E. L. et al. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica**, The Hague, v. 104, n. 1, p. 1–7, 1998.

MAISTRO, E. L. et al. Cytogenetic analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). **Cytologia**, Tokyo, v. 69, n. 2, p. 181-186, 2004.

MALABARBA, M. C. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 69-84.

MARCENIUK, A. P.; HILSDORF, A. W. da S.; LANGEANI, F. A ictiofauna de cabeceiras do rio Tietê, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 217-236, 2011.

MARTINS, C.; GALETTI JÚNIOR, P. M. Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, Oxford, v. 7, p. 363-367, 1999.

MARTINS, C. et al. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes:Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, The Hague, v. 127, p. 133–141, 2006.

MASLY, J. P.; PRESGRAVES, D. C. High-Resolution Genome-Wide Dissection of the Two Rules of Speciation in *Drosophila*. **PLoS Biol**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. 1890-1898, 2007.

MATSUBARA, K. et al. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 48, p. 18190–18195, 2006.

MAYR, E. Species, classification, and evolution. In: Arai, R.; Doi, Y. (Eds.). **Biodiversity and Evolution**. Tokyo: Natural Science Museum Foundation, 1995. p. 3-12.

MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, The Hague, v. 136, n. 3, p. 461–469, 2009.

MELO, M. R. S. de; BUCKUP, P. A. *Characidium stigmosum*(Characiformes: Crenuchidae): A new species of Characidiin fish from central Brazil. **Copeia**, Washington, v. 4, p. 988-993, 2002.

MENEZES, N. A. et al. Peixes de riacho da floresta costeira atlântica brasileira: um conjunto pouco conhecido e ameaçado de vertebrados. In: II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Função e Manejo. 1990. Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1990. p. 290-295.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Distribution of sex chromosomes mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, Florence, v. 46, p. 115–125, 1993.

MULLER, H. J. Bearing on the *Drosophila* work on systematics. In: Huxley, J. S. (Ed). **The New Systematics**. Oxford: Clarenton Press, 1940. p. 185-268.

MULLER, H. J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 1, p. 2-9, 1964.

NANDA, I. et al. Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1-10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 132, n. 3, p. 165-181, 2011.

NAVAJAS-PÉREZ, R. et al. Characterization of RUSI, a telomere-associated satellite DNA, in the genus *Rumex* (Polygonaceae). **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 124, p. 81-89, 2009.

NEGRI, I. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. **Proceedings of the Royal Society B**, United Kingdom, v. 273, n. 1599, p. 2409-2416, 2006.

NOLETO, R. B. et al. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. **Journal of Fish Biology**, London, v. 75, p. 448-453, 2009.

NOSIL, P.; FUNK, D. J.; ORTIZ-BARRIENTOS, D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, p. 375-402, 2009.

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

PANSONATO-ALVES, J. C. et al. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 77-86, 2010.

PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotypic conservatism in samples of *Characidium* cf. *zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): Physical mapping of ribosomal genes and natural triploidy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 2, p. 208-213, 2011.

PANSONATO-ALVES, J. C. et al. Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**, London, v. 78, p. 183–194, 2011.

PARANÁ. Secretária do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Instituto Ambiental do Paraná. **Avaliação ambiental estratégica da bacia do turvo**. Curitiba: IAP, 2009. Disponível em:
<http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/EIA_RIMA/Avaliacao_Ambiental_Estrategica_a_Rio_Turvo.pdf> . Acesso em: 01. nov. 2012.

PARISE-MALTEMPI, P. P. et al. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic Genome Research**, New York, v. 116, p. 218-223, 2007.

PAZIAN, M. F. et al. Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **Genetica**, 24 jan. 2013. [Epub ahead of print]. Disponível em:
http://download.springer.com/static/pdf/561/art%253A10.1007%252Fs10709-013-9701-1.pdf?auth66=1363979255_f61ce521642ea6ec7ebcae7d2dfdae88&ext=.pdf.
Acesso em: 03 de março de 2013.

PICONE, B. et al. A phylogenetic analysis of human syntenies revealed by chromosome painting in Euarchontoglires orders. **Journal of Mammalian Evolution**, London, v. 18, n. 2, p. 131-146, 2011.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

POSTIGLLONI, A.; BRUM-ZORRILLA, N. Non-relationship between nucleolus and sex chromosome system Xy_p in *Chelymormpha variabilis* bohemian (Coleoptera: Chrysomelidae). **Genetica**, The Hague, v. 77, n. 2, p. 137-141, 1988.

QVARNSTRÖN, A.; BAILEY, R. I. Speciation through evolution of sex-linked genes. **Heredity**, Edimburgo, v. 102, p. 4-15, 2009.

RÁB, P. et al. Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker - the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 863-873, 2008.

RAIO, C. B.; BENNEMANN, S. T. A ictiofauna da bacia do rio Tibagi e o projeto de construção da UHE Mauá, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas da Saúde**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 15-20, 2010.

RENS, W. et al. The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. **Genome Biology**, London, v. 8, p. R243.1-R243.21, 2007.

RIBEIRO, A. C. 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**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.

RIBEIRO, A. C. et al. Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, München, v. 17, n. 2, p. 157-164, 2006.

ROCHA, O. et al. Animal invaders in São Paulo state reservoirs. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 631-642, 2011.

RÖHME, D. et al. Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes. **Cell**, Maryland Heights, v. 36, p. 783-788, 1984.

ROLLA, A. P. P. R.; ESTEVES, K. E.; ÁVILA-DA-SILVA, A. O. Feeding ecology of a stream fish assemblage in an Atlantic Forest remnant (Serra do Japi, SP, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 65-76, 2009.

SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; TRAUT, W. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. **Chromosome Research**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 83-94, 2012.

SALLUN, A. E. M.; SUGUIO, K.; STEVAUX, J. C. Proposição Formal do Alogruppo Alto Rio Paraná (SP, PR e MS). **Revista do Instituto de Geociências –USP**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 49-70, 2007.

SÃO PAULO. Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos. Comitê da Bacia Hidrográfica do Baixo Tietê. **Fundamentos para a implantação da cobrança pelo uso dos recursos hídricos**. São Paulo: Comitê da Bacia Hidrográfica do Baixo Tietê, 2009.

Disponível em:
<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/cobranca/pdf/fundamentacao_cobranca_05.pdf>.
Acesso em: 01 nov. 2012.

SCALENGHE, F. et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 82, p. 205-216, 1981.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, The Hague, v. 139, p. 1499–1508, 2011.

SERRA, J. P.; CARVALHO, F. R.; LANGEANI, F. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo: composition and biogeography. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 81-86, 2007.

SERRANO, J.; YADAV, J. S. Chromosome number and sex-determining mechanisms in Adephagan Coleoptera. **The Coleopterists Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 335-357, 1984.

SHAW, D. D. Chromosomal hybrid zones in Orthopteroid insects. In: ACHLEY, W. R.; WOODRUFF, D. (Eds.) **Evolution and speciation**. London: Cambridge University Press, 1981. p 146-170.

SHIBATTA, O. A. et al. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. et al. (Eds.). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, 2002. Capítulo 22. p. 403-423.

SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 125-134, 2007.

SHS - Consultoria e Projetos de Engenharia S/S Ltda. **Plano das bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí.** Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/PB/PB0407_Cap03.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2012.

SILVA, A. R. da; MAISTRO, E. L. Cytogenetic divergence between two sympatric species of Characidium (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado River, Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 3, p. 459-463, 2006.

SILVA, M. da et al. Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic Genome Research**, New York, v. 134, p. 303-307, 2011.

SILVEIRA, L. G. G. et al. *Characidium xanthopterus* (Ostariophysi: Characiformes: Crenuchidae): a new species from the Central Brazilian Plateau. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 169-174, 2008.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 110, p. 134-143, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, New York, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosomes-Organization and Function**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. 287p.

TAKEHANA, Y. et al. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. **Chromosoma**, Berlin, v. 116, n. 5, p. 463-470, 2007.

TAO, Y. et al. Genetic dissection of hybrid incompatibilities between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. I. Differential accumulation of hybrid male sterility effects on the X and autosomes. **Genetics**, Austin, v. 164, p. 1383-1397, 2003.

TAPHORN, D. C. B.; MONTANA, C. G.; BUCKUP, P. *Characidium longum* (Characiformes: Crenuchidae), a new fish from Venezuela. **Zootaxa**, Salt Lake City, v. 1247, p. 1-12, 2006.

TELENIUS, H. et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, San Diego CA, v. 13, p. 718-725, 1992.

TEODORO, V. L. I. et al. O Conceito de Bacia Hidrográfica e a Importância da Caracterização Morfométrica para o Entendimento da Dinâmica Ambiental Local. **Revista Uniara**, Araraquara, n. 20, p. 137-155, 2007.

TERUEL, M. et al. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 17, p. 11-18, 2009.

THORNTON, K.; BACHTROG, D.; ANDOLFATTO, P. X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: no evidence for faster-X protein evolution. **Genome Research**, New York, v. 16, p. 498-504, 2006.

TRUE, J. R.; WEIR, B. S.; LAURIE, C. C. A genome-wide survey of hybrid incompatibility factors by the introgression of marked segments of *Drosophila mauritiana* chromosomes into *Drosophila simulans*. **Genetics**, Austin, v. 142, p. 819-837, 1996.

VALENTE, R. de M. et al. (Org.) **Conservação de aves migratórias neárticas no Brasil**. Belém: Conservação internacional, 2011. 400 p. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br>>, acesso em: 29 out. 2012.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

VICARI, M. R. et al. Cytogenetics and Biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu river. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 2, p. 297-303, 2006.

VICARI, M. R. et al. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, The Hague, v. 134, n. 3, p. 311-317, 2008.

VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, p. 1094–1116, 2010.

VICARI, M. R. et al. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, The Hague, v. 139, p. 1073-1081, 2011.

VERMEESCH, J. R. et al. Tetrasomy 12pter-12p13.31 in a girl with partial Pallister-Killian syndrome phenotype. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 48, p. 319-327, 2005.

VOLTOLIN, T. A. et al. Origin and molecular organization of supernumerary chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. **Genetica**, The Hague, v. 138, p. 1133-1139, 2010.

WEISE, A. et al. High-throughput sequencing of microdissected chromosomal regions. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 18, p. 457-462, 2010.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and south eastern Brazil. In: HEYER, W. R.; VANZOLINI, P. E. (Eds.) **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 379-427.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from Eastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, München, v. 10, n. 1, p. 1-43, 1999.

WHITE, M. J. D. **Modes of speciation**. San Francisco: W. H. Freeman, 1978. 455 p.

WHITE, T. J. et al. **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.

WU, C-I. The genic view of the process of speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 14, n. 6, p. 851-865, 2001.

ZHANG, L. et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, p. 5847-5851, 1992.

ZHANG, Q. et al. Sex Determination Mechanisms in Fish. **Journal of Ocean University of China**, Qingdao, v. 8, n. 2, p. 155-160, 2009.

ZHOU, R. N.; HU, Z. M. The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomic research. **Current Genomics**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 67-72, 2007.

Anexos

Anexo 1- Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/ IBAMA/ SISBIO: 15117-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1	Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular	
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari
CPF: 952.846.480-72	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

Anexo 2- Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa -

 **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 07/2011

Protocolo UEPG – 05057/2011

Título – “Citogenética Molecular em Peixes Neotropicais”.

Interessado – Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Data de Entrada – 31/03/2011

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
02/05/2013

Considerações

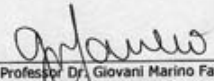
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização 30 exemplares de cada espécie/população dos peixes em estudo.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.


Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Retoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 3- Obtenção de Cromossomos Mitóticos (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA - FILHO, 1978)

A obtenção de cromossomos mitóticos consiste em injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso. Após este procedimento deve-se manter o peixe em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos.

Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha. Incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.

Acrescentar algumas gotas de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm. Repetir o último passo. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material. Acondicionar em microtubos, podendo ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

Anexo 4-Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandamento-C (SUMNER, 1972).

As lâminas contendo o material celular devem ser tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 10 minutos, lavando-se com água destilada logo em seguida. Posteriormente incuba-se a preparação em hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) a 5%, recém preparada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada. Imersão a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante

40 minutos. Por fim lavar bem, com água destilada, secar ao ar e corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo 5-Microdissecção

A suspensão celular deve ser gotejada sobre uma lamínula, posteriormente corada em Giemsa 2% (v/v) por 5 minutos e lavada em água destilada. As microdissecções cromossômicas foram realizadas em microscópio invertido (Olympus) equipado com microdissector mecânico (Eppendorf). Os cromossomos W de *Characidium gomesi* foram microdissectados com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 µm. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo, onde foi realizada a primeira amplificação utilizando-se o kit *GenomePlex® Whole Genome Amplification*.

Anexo 6-Amplificação do cromossomo microdissectado e produção da sonda

Foram microdissectados oito cromossomos W subtelocêntricos de um indivíduo fêmea de *Characidium gomesi*, e posteriormente amplificados por meio do kit de amplificação *GenomePlex® Whole Genome Amplification*. Os cromossomos foram alocados em um micro-tubo de 200 µm. Posteriormente adicionar 9 µm de água destilada e autoclavada no material; confeccionar o tampão lise em separado, adicionando 0,1 µm de proteinase K+ 1,6 µm de 10X lysis. Vortexar. Em seguida, adicionar 1 µm de tampão lise ao micro-tubo contendo os cromossomos. Misturar; incubar o DNA mix a 50°C por 1 hora; aquecer 99°C por 4 minutos e transferir imediatamente para o gelo. Misturar novamente.

Adicionar 2 µm do *Single Cell Library Preparation* 1X na amostra e em seguida adicionar também 1 µm de Solução Estabilizadora. Misturar bem. Aquecer a 95°C por 2 minutos; transferir para o gelo. Misturar bem. Transferir para o gelo. Adicionar 1 µm da enzima *Library Preparation*. Misturar. Colocar a amostra no termociclador, com o seguinte ciclo: 16°C—20 minutos; 24°C—20 minutos; 37°C—20 minutos; 75°C—5 minutos e por fim esperar esfriar a 4°C. A amostra pode ser utilizada na próxima reação no mesmo dia ou estocada a 20°C negativos por até 3 dias. Para a reação de amplificação, adicionar ao produto lisado 7,5 µm de *Amplification Master Mix* 10X; 48,5 µm de água; 5,0 µm de WGA-DNA

polimerase. Misturar e colocar a reação no termo ciclador a: 95°C—3 minutos; 94°C—30 segundos; 65°C—5 minutos, repetindo por 25X; por fim, alcançar 4°C.

Anexo 7-Marcação de sondas por *nick translation*

As reações de *nick translation* seguiram as orientações do fabricante (Roche). Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x µl água qsp; x µl sonda (equivalente a concentração de 1000 µg/µl); 4 µL mix de *nick translation*; completar para o volume total de 20 µl; permanecer durante 1 hora e 30 minutos a 15° C; interromper aquecendo por 15 minutos a 65° C.

Anexo 8- Marcação de sondas por PCR

A sonda de 18S foi marcada por meio do método PCR, usando biotina-16-dUTP (Roche®). O PCR marcado com primers específicos foi realizado para o rDNA usando 20 ng de molde de DNA, 1X *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM de dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM biotina-16-dUTP, 1 µM de *primers*, 2mM MgCl₂ e 0.05 U/µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).

Anexo 9-Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS 1X, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo *overnight* a 37⁰C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42⁰C e, em seguida, lavadas em *Tween* 20, por 5 minutos; incubação em tampão NFDM/Anti-digoxi rodamina ou NFDM/Estreptavidina a 5%, por 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em *Tween* 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “*antifade*” (Fluka).