

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

VIVIANE DEMETRIO DO NASCIMENTO

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE
DE ESPÉCIES EM PARODONTIDAE (ACTINOPTERYGII, CHARACIFORMES)

PONTA GROSSA

2015

VIVIANE DEMETRIO DO NASCIMENTO

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE
DE ESPÉCIES EM PARODONTIDAE (ACTINOPTERYGII, CHARACIFORMES)

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

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

N244 Nascimento, Viviane Demetrio do
Estudo citogenético e molecular para
avaliação da diversidade de espécies em
Parodontidae (Actinopterygii,
Characiformes/ Viviane Demetrio do
Nascimento. Ponta Grossa, 2015.
127f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa e Universidade do Centro
Oeste do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
Vicari.

1.Citogenética. 2.DNA barcode.
3.Evolução cariotípica. 4.Apareiodon.
5.Apareiodon ibitiensis. I.Vicari, Marcelo
Ricardo. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Universidade do Centro Oeste
do Paraná. Mestrado em Ciências
Biológicas. III. T.

CDD: 576.312



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. 02/2015

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 **Viviane Demétrio do Nascimento**.

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, 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) **Viviane Demétrio do Nascimento**, 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), Dr. Daniel Rodrigues Blanco (UTFPR) e Dr^a Michelle Orane Schemberger (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: "**Estudo Citogenético e Molecular para Avaliação da Diversidade de Espécies em Parodontidae (Actinopterygii, Characiformes)**". 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, 24 de fevereiro de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari _____

Prof Dr. Daniel Rodrigues Blanco _____

Dr^a Michelle Orane Schemberger _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar em todos os momentos, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais Genesio e Gercina por ter me dado muito mais que a vida. Ensinar-me valores e sempre me guiaram pelo caminho do bem. Pai, apesar do imenso vazio que você deixou com a sua partida, sei que estará sempre ao meu lado. Mãe, obrigada por ter sempre me apoiado e entendido as minhas ausências.

Aos meus irmãos Lígia, Wagner, Djonatas e Andrey, pelo amor incondicional, sempre. Vocês são a minha certeza de que nunca estarei só.

Ao meu grande amor e amigo Daniel que sempre esteve ao meu lado em todas as horas, compartilhando cada etapa deste trabalho. Obrigada pelo seu olhar de apoio, pelas suas palavras de incentivo, pelos seus gestos de compreensão. Te amo.

Aos meus sobrinhos Nathan, Vinícius, Lucas e Samuel pelos bons momentos de descontração e brincadeiras.

A todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao meu Orientador Professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari pelo seu grande conhecimento e profissionalismo. Obrigada pela orientação, pelo tempo dedicado, pelos “puxões de orelha”, pela amizade, você contribuiu muito para o meu crescimento. Te admiro muito.

A minha co-orientadora professora Dra. Mara Cristina de Almeida pela amizade, pelo auxílio nas atividades de laboratório e por sanar inúmeras dúvidas durante a realização deste trabalho.

Aos professores Roberto Ferreira Artoni, Viviane Nogaroto Vicari e Matheus Henrique Santos, pelo apoio, por compartilharem seus conhecimentos e pela amizade.

A minha amiga Kaline que não poupou esforços para compartilhar seus conhecimentos, sempre pronta a ajudar e também se mostrou uma grande amiga para todas as horas.

Aos amigos Lucas e Cleberson que muitas vezes dividimos os medos e as inseguranças, mas também compartilhamos alegrias e brincadeiras.

A minhas amigas Lúcia, Rafaela e Mayara, obrigada pela confiança de sempre poder contar com vocês.

Aos colegas de laboratório Patrícia, Marcela, Jordana, Michele, Luiz, Thaís, Elisa e Larissa que sempre me ajudaram durante este trabalho.

Ao Miguel Airton Carvalho pelo apoio nas atividades de laboratório.

Ao Rafael pela grande ajuda nas análises de sequenciamento.

Agradeço a secretária Zoli, pelas gentilezas e esclarecimentos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação, pelo investimento, apoio, e a pela infraestrutura.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e ao IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, por conceder a licença para a coleta do material utilizado.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A diversidade de espécies de peixes Neotropicais é subestimada. Muitos são os fatores que levam a estas estimativas, como a falta de amostragem de regiões de pequenos córregos, a ampla gama de ambientes diferentes que predispõem a fatores de isolamento, entre inúmeros outros. Também contribui a ocorrência de complexo de espécies, onde populações morfologicamente semelhantes são geneticamente isoladas quanto ao fluxo gênico. A família Parodontidae (Teleostei: Characiformes) é relativamente pequena, com 32 espécies válidas e dividida em três gêneros: *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*. Representantes destes peixes apresentam inúmeros caracteres diagnósticos homoplásicos, os quais dificultam sobremaneira a identificação de espécies. Neste estudo foi avaliado a validade de *Apareiodon* sp. (população do rio Verde - Alto Rio Tibagi), quando comparada à espécie morfologicamente semelhante *Apareiodon ibitiensis*. Os resultados citogenéticos demonstraram diferenças cariotípicas para o denominado *Apareiodon* sp., o qual foi demonstrado ocorrer para a bacia do rio Paranapanema, enquanto *A. ibitiensis* é visualizado para a bacia do rio Tietê. Adicionalmente, foi discutido o papel da diferenciação do cromossomo W na especiação de *Apareiodon*. A divergência nucleotídica do marcador Barcode corrobora a ocorrência de espécies divergentes para *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. e também para o *A. ibitiensis* da bacia do rio São Francisco. Também foi realizada uma análise integrada de número de cúspides nos dentes sinfiseanos, citogenética e divergência nucleotídica do marcador Barcode para seis diferentes populações identificadas morfologicamente como *Apareiodon affinis*. Neste estudo, os pontos de amostragem do Alto Rio Paraná mostraram a mesma constituição cariotípica e baixo nível de divergência genética. Já as populações do Alto Rio Cuiabá, Alto Rio Paraguai e Alto Rio Uruguai (Sistema do Baixo Rio Paraná) mostraram estruturas citogenéticas definidas em suas populações, no entanto, um baixo valor de divergência genética. Ainda, quando comparadas as populações do Alto Rio Paraná às do Baixo, tanto a citogenética quanto a divergência genética demonstraram a ocorrência de espécies distintas. Desta forma, este estudo buscou avaliar a ocorrência destes pares de espécies e demonstrou a ocorrência de populações morfologicamente semelhantes, porém geneticamente divergentes e com restrição ao fluxo gênico.

Palavras-chave: Citogenética, DNA barcode, Evolução cariotípica, *Apareiodon*, *Apareiodon ibitiensis*

ABSTRACT

The Neotropical fish species diversity is underestimated. There are many factors that lead to these estimates, as the lack of sampling of headwaters regions, the wide range of different environments that predispose the insulation factors, among countless others. Yet, also contributes the occurrence of species complex, where morphologically similar populations are genetically isolated in gene flow. Parodontidae (Teleostei: Characiformes) is relatively small fish family, with 32 valid species and divided into three genera: *Parodon*, *Apareiodon* and *Saccodon*. Representative of these fish have innumeroshomoplastic diagnostics characters, which ones hinder the identification of species. This study evaluated the validity of the *Apareiodon* sp. species (Rio Verde population - Upper Rio Tibagi) compared to morphologically similar species *Apareiodon ibitiensis*. Cytogenetic results showed karyotype differences in *Apareiodon* sp., which has been shown to occur for the rio Paranapanema basin, while *A. ibitiensis* is founded in the rio Tietê basin. Yet, was discussed also the role of the W chromosome differentiation in *Apareiodon* speciation. The nucleotide divergence of the DNA barcode confirms the occurrence of different species to *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. and for *A. ibitiensis* of the Rio São Francisco basin. Yet, an integrated analysis of the number of cusps in premaxillary teeth, cytogenetics and nucleotide divergence using DNA barcode for six different populations identified morphologically as *Apareiodon affinis* was also performed. In this study, the Upper Paraná River sampling sites showed the same build karyotype and low genetic divergence. In this study, the Upper Rio Paraná sampling localities showed the same karyotype organization and low genetic divergence. However, in the Upper Rio Cuiabá, Upper Rio Paraguay and Upper Rio Uruguay populations (System Lower Rio Paraná) the cytogenetic was different among the populations, nevertheless, a low value of genetic divergence was founded too. Yet, when the Upper Rio Paraná population were compared to the Lower Rio Paraná population, both cytogenetics as genetic divergence demonstrated the occurrence of different species. Thus, this study aimed to evaluate the occurrence of these species pairs and demonstrated the occurrence of morphologically similar populations, but genetically divergent due to gene flow restriction.

Keywords: Cytogenetics, DNA barcode, Karyotype evolution, *Apareiodon*, *Apareiodon ibitiensis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração de uma bacia hidrográfica mostrando os afluentes, rio principal e a drenagem principal. Fonte: ANA, 2002 (com adaptações).....**15**
- Figura 2.** Mapa parcial da América do Sul, com destaque para as bacias hidrográficas em território brasileiro. Em 1 é apresentada a região das antigas Sete Quedas, atualmente inundada pela represa de Itaipu (2). A região a montante do ponto 2 é denominada Alto Rio Paraná e toda a drenagem a jusante é o Baixo Rio Paraná.....**20**
- Figura 3.** Foto dos representantes dos três gêneros da família Parodontidae mostrando o padrão de coloração (A -C). Foto de um representante do gênero *Apareiodon* evidenciando a face ventral plana (D) e as nadadeiras peitorais bem desenvolvidas (E).....**23**
- Figura 4.** Foto de um representante do gênero *Apareiodon* evidenciando a mandíbula (A), Dentes dos gêneros *Apareiodon* e *Parodon* (B) e Raio indiviso da nadadeira peitoral (C).....**24**
- Figura 5.** Ossos mandibulares direitos em vista medial, mostrando a presença de dentes para o gênero *Parodon* (A) e a ausência para o gênero *Apareiodon* (B e C). A direita em D - Estrutura bucal de *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon***25**
- Figura 6.** Esquema do modelo de Kimura-2-parameter.....**41**
- Figura 7.** Mapa parcial do Brasil com as divisões das bacias hidrográficas do Alto Rio Paraná e Rio São Francisco. Os pontos representam os locais de amostragem. Os quadrados representam *Apareiodon ibitiensis*, em (1) ribeirão Araras, bacia do rio São Francisco e (2) rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê (Alto Rio Paraná). Os círculos representam locais de amostragem de *Apareiodon* sp., em (3) rio Laranjinha, bacia do

rio das Cinzas-Paranapanema (Alto Paraná); (4) rio São João e (5) rio Verde, ambos da bacia do rio Tibagi-Paranapanema (Alto Paraná). O triângulo (6) representa o local de amostragem de *Apareiodon piracicabae*, rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê (Alto Rio Paraná).....69

Figura 8. Fotos dos dentes sinfiseanos de cinco populações do gênero *Apareiodon* evidenciando a variação do número de cúspides. Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do ribeirão Araras; (b) rio Passa Cinco; (c) *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha; (d) rio São João e; (e) rio Verde. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.....70

Figura 9. Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. em coloração convencional por Giemsa e bandamento C. Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do rio Passa Cinco, bacia do rio Tiete; (b) *Apareiodon ibitiensis* do Rio Ribeirão Araras, bacia do São Francisco, (c) *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha, bacia do rio Paranapanema; (d) *Apareiodon* sp. do rio São João e; (e) *Apareiodon* sp. do rio Verde, ambos da bacia do rio Tibagi-Paranapanema. Barra = 10 µm.....71

Figura 10. Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 5S (vermelho) e rDNA 18S (verde). Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do rio Passa Cinco; (b) *Apareiodon ibitiensis* do Rio Ribeirão Araras; (c) *Apareiodon* sp. do rio rio Laranjinha; (d) *Apareiodon* sp. do rio São João e; (e), *Apareiodon* sp. do rio Verde. Barra = 10 µm.....72

Figura 11. Dendograma de Neighbor-Joining, mostrando todas as espécies dos rios analisados juntamente com as espécies *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* as quais que foram utilizadas como outgroup. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por bases.....73

Figura 12. Mapa parcial da América do Sul evidenciando o sistema hidrográfico do rio Paraná. Em (A) é apresentado o local das antigas Sete Quedas, inundadas pela represa de Itaipu (B). Este ponto separa o denominado Alto Rio Paraná do Baixo Rio Paraná. Os locais de amostragens de *A. affinis* estão representados por círculos pretos: (1) rio Passa Cinco, (2) rio Piracicaba, (3) rio Paraná – lago da represa de Itaipu, (4) Alto Rio Cuiabá, (5) Alto Rio Paraguai e, (6) Alto Rio Uruguai. O triângulo representa o ponto de amostragem de *Apareiodon piracicabae* (7).....**88**

Figura 13. Fotos dos dentes sinfiseanos, evidenciando o número de cúspides dos exemplares de *Apareiodon affinis* das populações do Alto Rio Paraná. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.....**89**

Figura 14. Fotos dos dentes sinfiseanos, evidenciando o número de cúspides dos exemplares de *Apareiodon affinis* das populações do Baixo Rio Paraná. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.....**90**

Figura 15. Ideograma representativo dos cariótipos de diferentes populações de *Apareiodon affinis* e de uma população de *Apareiodon piracicabae*. As cores das regiões marcadas representam os marcadores cromossômicos: heterocromatina constitutiva (preto), localização dos sítios rDNA 5S (azul), localização dos sítios de rDNA 18S (pink), localização dos sítios de DNA satélite pPh2004 (verde).....**91**

Figura 16. Dendograma de Neighbor-Joining, mostrando todas as populações de *A. affinis* analisadas juntamente com as espécies *Apareiodon piracicabae*, *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* as quais que foram utilizadas para enraizamento dos ramos. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por bases.....**92**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas.....	46
Tabela 2. Fórmula cariotípica e sítios de rDNA 5s e 18s de <i>Apareiodon</i> sp. e <i>Apareiodon ibitiensis</i> das localidades estudadas.....	67
Tabela 3. Divergência nucleotídica Kimura-2 parameter entre as espécies de <i>Apareiodon ibitiensis</i> das populações do ribeirão Araras e rio Passa Cinco e; <i>Apareiodon</i> sp., populações dos rios Laranjinha, São João e Verde.....	68
Tabela 4: Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas.....	77
Tabela 5. Fórmula cariotípica, fórmula cromossômica, sítios de rDNA 5s e 18s e sítios do DNAsatélite pPh2004 de <i>Apareiodon affinis</i> e <i>Apareiodon piracicabae</i> das localidades estudadas.....	86
Tabela 6. Divergência nucleotídica Kimura-2 parameter entre as populações de <i>A. affinis</i>	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ICTIOFAUNA NEOTROPICAL	14
1.2 CONTEXTO GERAL DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS	15
1.2.1 Bacia hidrográfica do Paraná	16
1.2.1.1 Bacia hidrográfica do rio Paranapanema	18
1.2.1.2 Bacia hidrográfica do rio Tiête	19
1.2.2 Bacia hidrográfica do rio São Francisco	21
1.3 BIOLOGIA, SISTEMÁTICA E FILOGENIA DA FAMÍLIA PARODONTIDAE	21
1.4 TAXONOMIA E FILOGENIA DA FAMÍLIA PARODONTIDAE	25
1.5 CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DA FAMÍLIA PARODONTIDAE	28
1.6 MARCADORES MOLECULARES	36
1.7 DNA BARCODE	38
2 JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E METAS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAL	45
3.2 METODOLOGIAS	45
4 RESULTADOS	49
4.1 CAPÍTULO 1	50
Diferenciação cromossômica, alta divergência genética e morfologia similar: o caso de <i>Apareiodon ibitiensis</i> e <i>Apareiodon</i> sp. (Characiformes: Parodontidae)	50
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS	57
DISCUSSÃO	60
4.2 CAPÍTULO 2	74
Incertezas taxonômicas em <i>Apareiodon affinis</i> (Characiformes: Parodontidae): uma análise integrada de dentes sinfiseanos, citogenética e DNA Barcode	74
RESUMO	74
INTRODUÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODOS	77
RESULTADOS	79

DISCUSSÃO	81
5. CONCLUSÃO	93
6. REFERÊNCIAS.....	95
7. ANEXOS	113
Anexo 1 – Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO	113
Anexo 2 – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.	114
Anexo 3 - Obtenção de cromossomos mitóticos.....	115
Anexo 4- Obtenção de cromossomos mitóticos via cultura de campo (Blanco et al., 2012).	116
Anexo 5 - Detecção da heterocromatina constitutiva: bandas-BSG (SUMENER, 1972,com algumas adaptações)	117
Anexo 6 - Reação de mini preparação plasmidial (kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare)	118
Anexo 7- Marcação de sondas por nick translation, kit biotin-nick translation mix (Roche Applied Science)	119
Anexo 8- Marcação de sondas por nick translation, kit dig-nick translation mix (Roche Applied Science)	120
Anexo 9 - Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	121
Anexo 10 - Extração dos dentes.....	124
Anexo 11 - Extração de DNA	125
Anexo 12 - Obtenção das sequências parciais do gene citocromo c oxidase I.....	126
Anexo 13 - Purificação do produto da PCR pelo kit da GE healthcare - illustraGFX PCR DNA	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 ICTIOFAUNA NEOTROPICAL

Os peixes constituem o grupo mais diversificado entre os vertebrados, com cerca de 32.500 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2015). Os ambientes de água doce neotropical apresenta a ictiofauna mais rica de todo o mundo. Estima-se que o planeta possua 13.000 espécies de peixes de água doce, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não catalogadas (LOWE McCONNELL, 1999; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

Os representantes nas águas doces do Brasil são pertencentes a três linhagens: Chondrichthyes, Actinopterygii e Dipnoi, sendo a maioria pertencente ao grupo dos Actinopterygii. A diversidade é distribuída de forma bastante heterogênea, já que apenas cinco ordens detêm mais de 95% das espécies de peixes de água doce conhecidas no Brasil. A ordem Characiformes é a mais numerosa seguida dos Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Gymnotiformes (ROSA; LIMA, 2014).

A grande diversidade de peixes existente nas bacias hidrográficas tropicais e subtropicais da região Neotropical demonstram o aumento significativo do conhecimento sobre a ictiofauna de água doce do Brasil, compreendendo 2.587 espécies catalogadas até 2006 (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007).

A justificativa para esta extraordinária diversificação da ictiofauna neotropical ainda é pouco conhecida já que os habitats de água doce disponíveis são menos do que 0,01% de toda a água no planeta e menos de 30% deste total constitui água doce neotropical (MONTROYA-BURGOS, 2003).

No entanto, é indispensável a caracterização da bacia hidrográfica no desenvolvimento de projetos visando à dinâmica ambiental local, para um melhor entendimento dos mecanismos que dirigem a fauna dos peixes (SANTOS et al., 2012).

1.2 CONTEXTO GERAL DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS

Bacia hidrográfica segundo Barrella et al. (2000) é uma região geográfica delimitada por divisores de água nas regiões mais altas do relevo, drenadas por um rio e seus afluentes, onde as águas pluviais, ou escoam superficialmente formando os riachos e rios, ou infiltram no solo para formação de nascentes e do lençol freático, tal que toda vazão efluente seja descarregada em um curso de água principal (Figura 1).

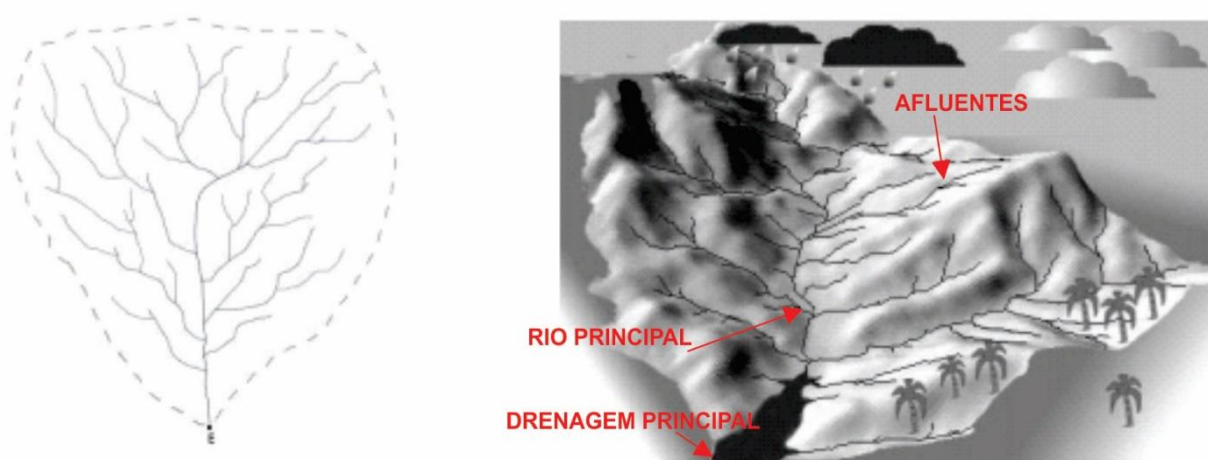


Figura 1. Ilustração de uma bacia hidrográfica mostrando os afluentes, rio principal e a drenagem principal. Fonte: BRASIL, 2002 (com adaptações).

As águas superficiais escoam para as partes mais baixas do terreno, formando riachos e rios, sendo que as cabeceiras são formadas por riachos que nascem em serras e montanhas e à medida que a água de vários riachos se juntam, formam os

primeiros rios, esses pequenos rios recebem água de outros riachos, formando rios maiores até desaguar no oceano (BARELLA, 1998).

O Brasil é dividido em 12 regiões hidrográficas (bacia ou conjunto de bacias hidrográficas próximas onde o rio principal desemboca no mar ou em território estrangeiro) sendo elas: Amazonas, Tocantins-Araguaia, Parnaíba, São Francisco, Paraná, Paraguai, Uruguai, Costeiras do Norte, Costeiras do Nordeste Ocidental, Costeiras do Nordeste Oriental, Costeiras do Sudeste e Costeiras do Sul (BRASIL, 2002; Figura 2).

1.2.1 Bacia hidrográfica do Paraná

A bacia hidrográfica do Paraná, segunda maior bacia do mundo, está localizada entre as coordenadas 15° 25' 47" e 26° 50' 55" de latitude sul e 43° 34' 55" e 55° 55' 53" de longitude oeste, abrange 10% do território nacional com 891.000 km² (Figura 2). Esta bacia divide-se em duas sub-bacias: a do Alto Rio Paraná que abrange rios de grande porte como Tietê, Parnaíba, Grande, Paranapanema, Iguaçu, Piquiri, entre outros (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005); e a do Baixo Rio Paraná que detém grandes rios, como os rios da Plata, Uruguai, Baixo Paraná, Paraguai (BRITSKI; LANGEANI, 1988). Cada uma destas drenagens contém uma série de bacias hidrográficas de rios menores, as quais geram uma grande diversidade de ambientes aquáticos (Figura 2).

A região do Alto Rio Paraná (Figura 2) abrange toda a drenagem acima da barragem da Usina hidroelétrica de Itaipu, cuja formação inundou a barreira física natural dos saltos de Sete Quedas, deslocando a delimitação entre a ictiofauna montante e jusante aos saltos em 150 quilômetros abaixo, possibilitando a dispersão

de espécies do Médio Rio Paraná para trechos a montante (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Essa região, em sua última grande revisão, conta com aproximadamente 310 espécies, de 11 ordens e 38 famílias, representado predominantemente por Siluriformes e Characiformes (LANGEANI et al., 2007).

Por sua vez, a bacia do Baixo Rio Paraná tem seu início a partir da Usina Hidroelétrica de Itaipu, recebendo águas de outros rios para formar o chamado sistema dos Rios da Plata-Uruguai-Paraná-Paraguai (BRITSKI; LANGEANI, 1988; MENEZES, 1988; WEITZMAN, 1988; LANGEANI, 1990; MENEZES, 1996; CASTRO; CASSATI, 1997). Nessa região, o rio Paraguai (Figura 2) é um dos seus importantes formadores, e na região denominada Alto Rio Paraguai recebe a drenagem do rio Cuiabá (SAMPAIO, 2008). As cidades de Cuiabá, Várzea Grande, Rondonópolis e Cáceres, no Mato Grosso, e Corumbá, no Mato Grosso do Sul, estão localizadas na Bacia do Alto Paraguai, que é caracterizada por abranger um dos maiores divisores de águas entre a Bacia Amazônica e a Bacia do Paraguai-Paraná (SAMPAIO, 2008). Ao sudeste da região do Baixo Rio Paraná incorpora-se a drenagem do rio Uruguai (Figura 2), sendo delimitada ao norte e nordeste pela Serra Geral, ao Sul pela fronteira com a República oriental do Uruguai, a Leste pela depressão central Rio Grandense e a oeste pela Argentina (BRASIL, 2008). Na porção inicial o rio Uruguai delimita os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que com a confluência com o Rio Peperi-Guaçu, passa a fazer a divisa do Brasil com a Argentina e em seguida da Argentina com o Uruguai. No total do seu percurso, o Rio Uruguai pode ser dividido por barreiras físicas em Alto, Médio e Baixo Rio Uruguai (ZANIBONI-FILHO, 2003).

1.2.1.1 Bacia hidrográfica do rio Paranapanema

O rio Paranapanema é um importante afluente da bacia do Alto Rio Paraná (Figura 2). Suas nascentes estão localizadas na serra de Paranapiacaba, a menos de 100Km da costa Atlântica, numa latitude de 24°51' sul e longitude 48°10' oeste, a cerca de 900 metros acima do nível do mar. Faz a maior parte da fronteira entre os estados do Paraná e São Paulo, desaguando no rio Paraná após percorrer 929Km. Seus principais tributários são os rios Itararé, Cinzas, Pardo, Tibagi e Pirapó (ZILESLE; ARDIZZONE, 1979).

A bacia do rio das Cinzas é um importante afluente do Paranapanema e encontra-se totalmente no Estado do Paraná. Principal curso d'água do Norte Pioneiro, o Rio das Cinzas nasce na Serra de Furnas, no município de Piraí do Sul, a oeste da Escarpa Devoniana e deságua no rio Paranapanema (sistema do Alto Rio Paraná), na divisa dos municípios de Santa Mariana e Itambaracá. Possui uma extensão de 240 Km e sua bacia abrange uma área de drenagem total de 9.645 Km². Os principais afluentes do Rio das Cinzas são: o Ribeirão Grande, o Ribeirão Jaboticabal, o Ribeirão Vermelho e o Rio Laranjinha, também denominado “Rio do Peixe”, que é o principal afluente da margem esquerda (DEBONA et al., 2010). Todos os estudos realizados na bacia hidrográfica das Cinzas, registraram 88 espécies de peixes, pertencentes a cinco ordens e 20 famílias. As ordens Characiformes e Siluriformes foram as mais representativas em número de espécies, enquanto que as famílias mais representativas foram Characidae, Loricariidae e Anostomidae (DEBONA et al, 2010).

Por sua vez, a bacia hidrográfica do rio Tibagi compõe o principal afluente do rio Paranapanema, apresenta uma área aproximada de 24.712 km² e está situada na

porção leste do estado do Paraná, no sentido sul-norte. Sua nascente está localizada a 1.100 metros de altitude na Serra das Almas, região de Ponta Grossa-PR (MAACK, 1981). Atravessa o estado na direção norte, até desaguar no reservatório da Usina Hidrelétrica de Capivara, no rio Paranapanema a 298 metros de altitude (PINESE, 2002). Inúmeras novas descrições de espécies têm sido realizadas para esta bacia, a qual conta com um número superior a 150 espécies descritas, com representatividade das ordens Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (SHIBATTA et al., 2002; SHIBATTA et al., 2007; RAIIO; BENNEMANN, 2010).

1.2.1.2 Bacia hidrográfica do rio Tietê

O rio Tietê nasce a 840 metros de altitude, na cidade de Salesópolis (estado de São Paulo), situada na região da Serra do Mar. Atravessa o estado na direção de leste a oeste e deságua no rio Paraná, no município de Itapura, divisa entre São Paulo e Mato Grosso do Sul (Figura 2), pertencendo a região do Alto Rio Paraná (ALMEIDA et al., 1981; PONÇANO et al., 1981). O rio Tietê possui 1.100 quilômetros de extensão e está subdividido em 6 sub-bacias hidrográficas: Alto Tietê; Piracicaba; Sorocaba/Médio Tietê; Tietê/Jacaré; Tietê/Batalha e Baixo Tietê.

O rio Piracicaba é o maior afluente do rio Tietê, nasce da junção dos rios Atibaia e Jaguari, no município de Americana e após atravessar a cidade de Piracicaba, recebe as águas de seu principal afluente, o rio Corumbataí. A drenagem do rio Corumbataí está localizada na porção centro-oeste do Estado de São Paulo, tem aproximadamente 170.000 ha, com perímetro de aproximadamente 301,52 km, tendo 63,72 km de extensão na direção norte-sul e 26,80 km de extensão na direção leste-

oeste. É uma sub-bacia do Rio Piracicaba, estando situada à sua margem direita (VALENTE, 2001). Por sua vez, o rio Passa Cinco é um dos principais contribuintes do rio Corumbataí com localização na porção oeste desta bacia (VALENTE, 2001). Estudos de revisão da composição ictiofaunística para a bacia do rio Tietê são escassos. Marceniuk; Hilsdorfi e Langeani (2011) realizaram um levantamento ictiofaunístico para a sub bacia do Alto Tietê e encontraram 56 espécies, com uma composição bastante peculiar, distinta daquela encontrada no restante do Alto Rio Paraná, mostrando acentuado grau de endemismo e grande similaridade com bacias hidrográficas litorâneas. As demais sub bacias do Tietê tem uma fauna de peixes bastante similar à encontrada no Alto Rio Paraná (MARCENIUK; HILSDORFI; LANGEANI, 2011).



Figura 2. Mapa parcial da América do Sul, com destaque para as bacias hidrográficas em território brasileiro. Em 1 é apresentada a região das antigas Sete Quedas, atualmente inundada pela represa de Itaipu (2). A região a montante do ponto 2 é denominada Alto Rio Paraná e toda a drenagem a jusante é o Baixo Rio Paraná.

1.2.2 Bacia hidrográfica do rio São Francisco

A bacia hidrográfica do rio São Francisco (Figura 2), a terceira maior em extensão do Brasil, percorrendo 2.700km. Seu principal rio, o São Francisco, nasce na Serra da Canastra, em Minas Gerais, escoando no sentido Sul-Norte pela Bahia e Pernambuco, quando altera seu curso para o Sudeste, desaguardo ao Oceano Atlântico na divisa entre Alagoas e Sergipe. Devido à sua extensão e aos diferentes ambientes que percorre, a região está dividida em Alto, Médio, Sub-Médio e Baixo São Francisco (AMORIM et al., 2013; BRASIL, 2014).

A Ictiofauna da bacia do São Francisco segue o padrão característico para rios da América do Sul, no qual há uma dominância de espécies nas ordens Characiformes e Siluriformes é composta por aproximadamente 244 espécies, destas 173 ocorrem no estado de Minas Gerais, sendo que as famílias Characidae, Loricariidae, Rivulidae e Anostomidae são mais diversas (BRASIL, 2009).

1.3 BIOLOGIA, SISTEMÁTICA E FILOGENIA DA FAMÍLIA PARODONTIDAE

A ordem Characiformes, compreende 18 famílias: Chilodontidae, Distichodontidae, Citharinidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Lebiasinidae, Anostomidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae, incluindo Parodontidae. É considerada a mais abundante dentre os Ostariophysis, apresentando uma grande diversidade morfológica que tem sido uma fonte de informações valiosas para estudos da filogenia e morfologia deste grupo (BUCKUP, 1998; NELSON, 2006).

A família Parodontidae consiste em um grupo relativamente pequeno de peixes de água doce, com 32 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015), divididas em três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Saccodon* Kner, 1863; e *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (PAVANELLI; BRITSKI, 2003). Seus representantes estão amplamente distribuídos desde o Panamá até o rio da Prata (Argentina), exceto nos rios costeiros atlânticos ao sul do estado da Bahia (Brasil) e pacíficos ao sul do Equador, no canal do rio Amazonas e na Patagônia (STARNES; SCHINDLER, 1993; PAVANELLI, 2003; INGENITO; BUCKUP, 2005; PAVANELLI, 2006). Quanto aos gêneros, *Parodon* e *Apareiodon* tem distribuição ampla pelo continente sul americano, enquanto o gênero *Saccodon* está restrito ao norte do continente, sendo encontrado na bacia costeira no Panamá, Colômbia e Equador (PAVANELLI; BRITSKI, 2003).

A morfologia dos parodontídeos pode ser descrita por um corpo fusiforme cinza pálido (NOMURA, 1979) e coloração composta basicamente de listras, barras e manchas (Figura 3A, B e C) proporcionando um efeito obliterante em habitats rochosos e de água doce turbulentas (SAZIMA, 1980). Nestes peixes, as barbatanas peitorais e pélvicas são bem desenvolvidas (Figura 3D, E) e adaptadas para a estabilização do peixe sobre os fundos rochosos dos rios e riachos, onde são normalmente encontrados, alimentando-se de algas. O corpo apresenta a face ventral plana, conhecidos no Brasil como “canivetes”, “charutos”, “cigarilhas” e em outros países da América do Sul como “virolitos” ou “rollizos”, os quais habitam ambientes lóticos de riachos de cabeceira (PAVANELLI, 1999, 2003).

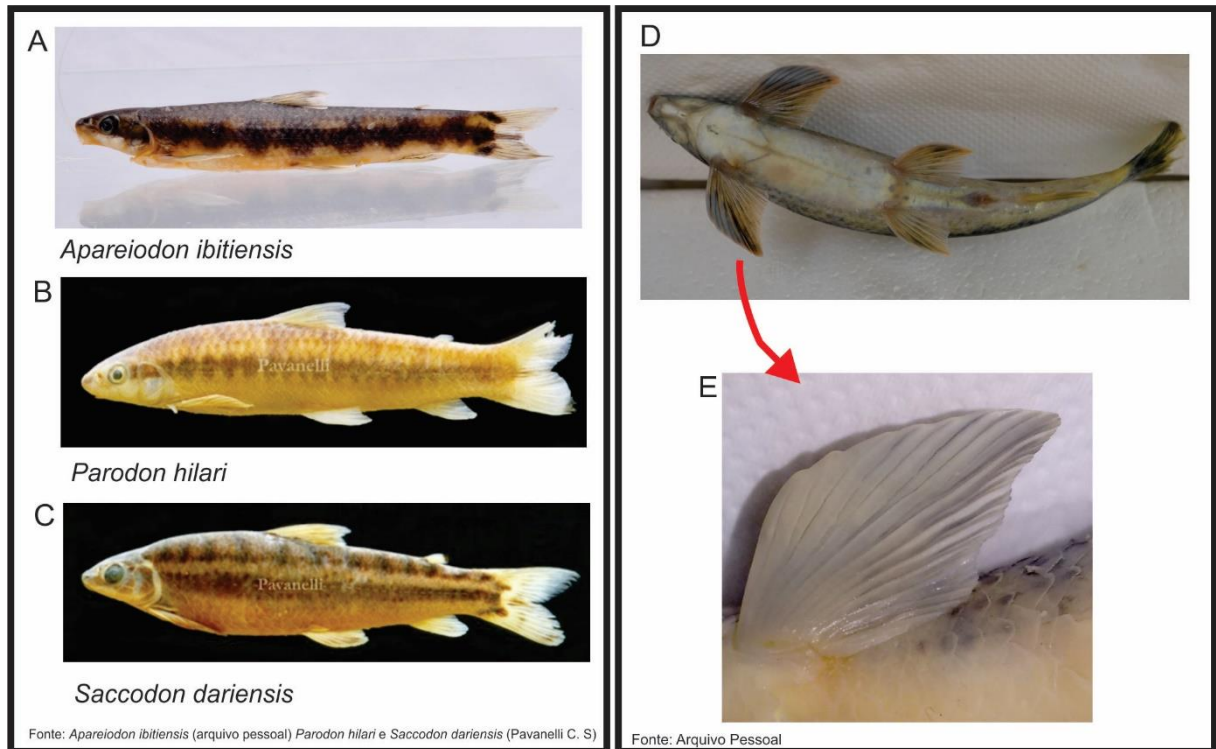


Figura 3. Foto dos representantes dos três gêneros da família Parodontidae mostrando o padrão de coloração (A -C). Foto de um representante do gênero *Apareiodon* evidenciando a face ventral plana (D) e as nadadeiras peitorais bem desenvolvidas (E).

Os parodontídeos são diferenciados dos demais Characiformes pela ausência de lábio superior; dentes pré-maxilares frouxamente ligados ao osso pré-maxilar pelo lado posterior de seu pedúnculo; presença de lamelas ósseas separando as trincheiras de dentes do osso pré-maxilar; dentes mandibulares, quando presentes, estão localizados na região lateral da boca e direcionados para dentro da cavidade bucal; ângulo-articular dobrado sobre a margem dorsal da parte posterior do dentário cobrindo parcialmente suas faces medial e lateral e; abertura dorsal da fossa pós-temporal delimitada somente pelo parietal e epoccipital (PAVANELLI, 1999). Ainda, nesta família de peixes a mandíbula tem formato de uma pá de bordo reto, sem dentes na borda anterior (Figura 4A), a pré-maxila está rodeada por uma série de pequenos dentes com cúspides arredondados (Figura 4B). O número de cúspides de dentes pré-maxilares pode ser um caráter confiável para o diagnóstico de espécies entre *Parodon*

e *Apareiodon*, mas não para espécies *Saccodon*, que são caracterizados pelo grande polimorfismo dentário (GARAVELLO, 1977).

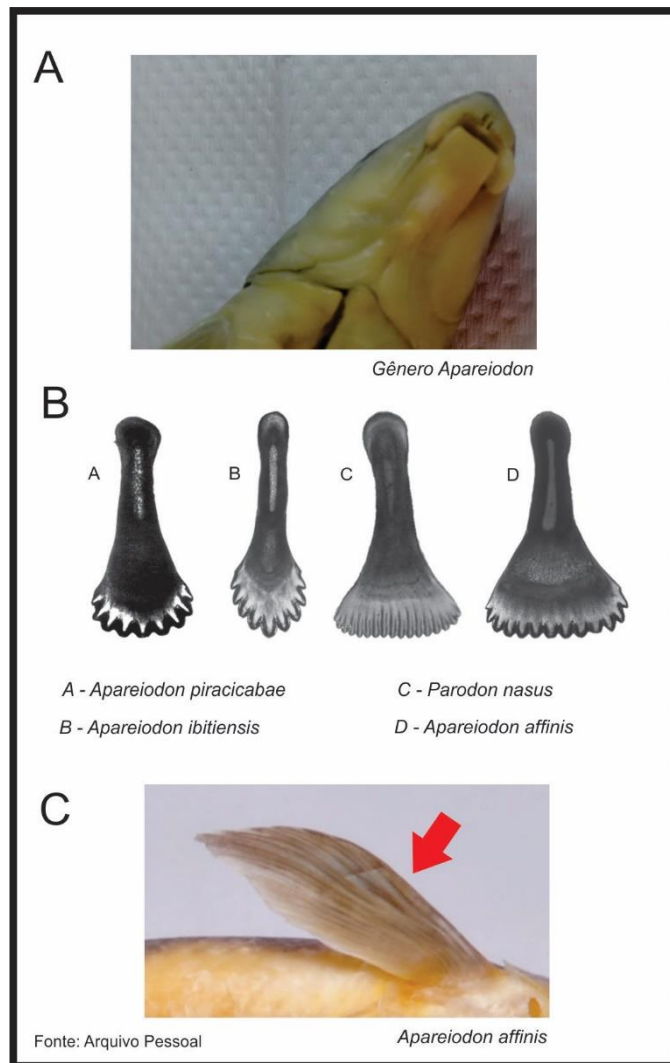


Figura 4. Foto de um representante do gênero *Apareiodon* evidenciando a mandíbula (A), Dentes dos gêneros *Apareiodon* e *Parodon* (B) e Raio indiviso da nadadeira peitoral (C).

Por sua vez, os três gêneros de Parodontidae têm sido caracterizados pela variação de dois caracteres: número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais - um raio em *Parodon* e *Apareiodon* (Figura 4C) e dois em *Saccodon*- e ausência de dentes na região lateral da mandíbula (*Apareiodon* e *Saccodon*) (Figura 5). Não obstante, o padrão de coloração pode também ser utilizado para diferenciá-los, onde as espécies *Apareiodon affinis*, *Apareiodon ibitiensis*, *Saccodon dariensis* e *Parodon hilari* apresentam o corpo composto por listras e *Parodon nasus*, *Apareiodon ibitiensis* a

coloração corporal é composta por barras (TRAVASSOS, 1955; ROBERTS, 1974a; PAVANELLI, 2003; 2007; INGENITO, 2008).

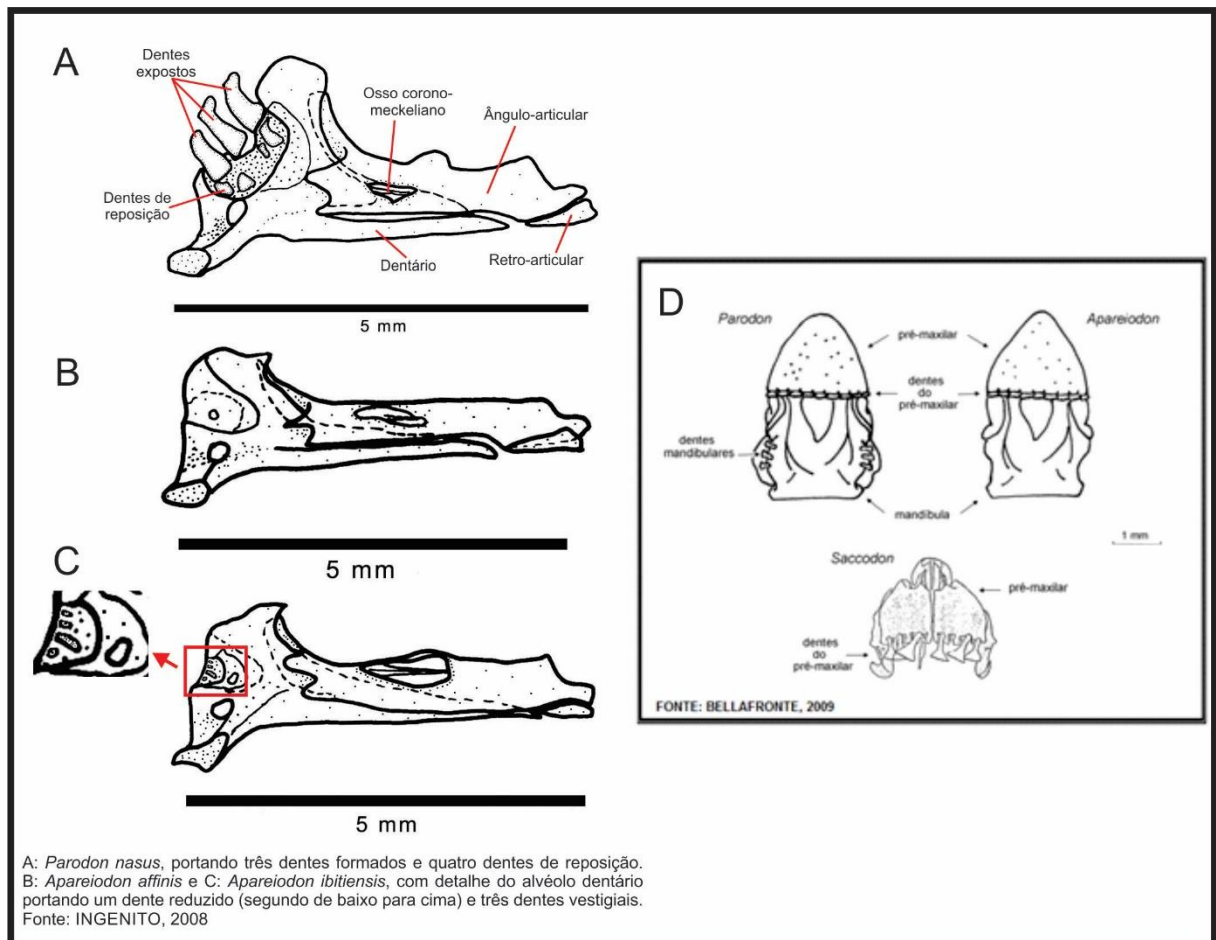


Figura 5. Ossos mandibulares direitos em vista medial, mostrando a presença de dentes para o gênero *Parodon* (A) e a ausência para o gênero *Apareiodon* (B e C). A direita em D - Estrutura bucal de *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*.

1.4 TAXONOMIA E FILOGENIA DA FAMÍLIA PARODONTIDAE

A primeira espécie da família Parodontidae foi descrita no início do século XIX, após a expedição de M. Plée, ao norte da América do Sul. Nesta expedição, M. Plée coletou exemplares de peixes no lago Maracaibo (Venezuela), os quais foram descritos por Achille Valenciennes em 1849 com o nome de *Parodon suborbitalis*, caracterizando uma nova espécie e gênero com diagnose principal no posicionamento da boca e dentição, principalmente a mandibular (CUVIER; VALLENCIENES, 1849).

Em 1863, Rudolf Kner, analisou os exemplares coletados no Equador por Wagner F. Moritz e descreveu o gênero *Saccodon*, ao propor a espécie *Saccodon wagneri*, diferenciando-o de *Parodon* principalmente pela ausência de dentes maxilares e mandibulares. Por sua vez, Carl H. Eigenmann em 1916 analisou exemplares de *Parodon piracicabae* e *Parodon affinis*. Nesta análise verificou a ausência de dentes mandibulares nessas espécies, que os diferenciava de *Parodon* e *Saccodon*, o que levou a descrição do novo gênero *Apareiodon*.

Schultz e Miles em 1943 analisaram os exemplares de *Parodon ecuadoriensis* Eigenmann e Henn, 1914, e verificaram um acentuado polimorfismo dentário, o qual justificaram para a descrição de um novo gênero *Parodontops*. Em 1974, Roberts descreveu detalhadamente o diversificado polimorfismo dentário de *Saccodon*, tornando *Parodontops* sinônimo júnior de *Saccodon*. O primeiro autor a reconhecer os parodontídeos como uma unidade distinta entre os demais Characiformes foi Carl H. Eigenmann em 1910, incluindo-os na subfamília Parodontinae, então pertencente à família Characidae. Contudo, ao longo de todos esses anos de história, cerca de 40 espécies de Parodontinae, atualmente 32 consideradas válidas, foram descritas e alocadas em diversas famílias e subfamílias até serem reconhecidas como uma família própria (Parodontidae) por GREENWOOD et al. (1966) e posteriormente validadas por outros autores (ROBERTS, 1974a, b; STARNES; SCHINDLER, 1993; BUCKUP, 1998; BONILLA et al., 1999; PAVANELLI, 1999, 2003, 2006, 2007; PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO; BUCKUP, 2005, 2007; CALCAGNOTTO; SCHAEFER; DESALLE, 2005; MALDONADO-OCAMPO et al., 2005; NELSON, 2006; FERREIRA-NETTO 2006; GRAÇA; PAVANELLI, 2007; MOREIRA, 2007).

Estudos sobre relações de parentesco na família Parodontidae capazes de analisar todos ou a maioria de seus representantes são escassos. INGENITO (2008)

utilizou método de parcimônia para análise filogenética de caracteres osteológicos e de morfologia externa, com 46 táxons terminais, sendo 28 espécies de Parodontidae, uma espécie não descrita de *Apareiodon* citado como *Parodon*, e 17 espécies de Characiformes como grupo externo. Neste estudo, o autor considerou o gênero *Saccodon* como um grupo irmão dos demais Parodontidae, e não encontrou evidências filogenéticas que sustentassem a manutenção do gênero *Apareiodon*, considerado-o sinônimo júnior de *Parodon*. Também, foi mostrado que a presença de dentes mandibulares para diagnosticar grupos monofiléticos é ineficaz, pois grupos definidos por este caráter são polifiléticos. Além disso, foi relatado que a ocorrência de dentes mandibulares podem variar intraespecificamente nas espécies *A. davisi* citado como *P. davisi*, *A. ibitiensis* citado como *P. ibitiensis*, *P. moreirai*, *A. tigrinus* citado como *P. tigrinus* e *Apareiodon* sp. citado como *Parodon* sp.. Entretanto, a extinção de *Apareiodon* ainda não é completamente aceita e continua a ser utilizada (BELLAFRONTÉ et al., 2011, 2013; SCHEMBERGER et al., 2011).

Em uma análise citogenética, Schemberger et al. (2011) realizaram uma análise de agrupamento para nove representantes da família Parodontidae. Neste estudo, foi utilizado uma comparação de características cromossômicas distintas (número e fórmula cariotípica, bandamento C, regiões organizadoras de nucléolo – RONS, hibridação *in situ* fluorescente - FISH - com as sondas rDNA 5S, rDNA 18S, pPh2004 e WAp). Os resultados da análise demonstraram que *Parodon* e *Apareiodon* formam clados distintos, a exceção de *Apareiodon affinis* do Alto Rio Paraná, a qual é mais próxima as espécies do gênero *Parodon*, indicando um maior grau de parentesco quando comparado com outras espécies do gênero *Apareiodon*.

A metodologia conhecida com DNA barcode, a partir do sequenciamento do DNA e análise de divergência nucleotídica do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I

(COI) foi recentemente utilizada para verificar as relações de parentesco de algumas espécies de Parodontidae (BELLAFRONTÉ et al., 2013). Nesta análise os autores confirmam os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* como unidades distintas dentro de Parodontidae, e a espécie *Apareiodon affinis* é mantida no gênero de origem.

Portanto, as relações filogenéticas são controversas em Parodontidae por apresentarem poucos e sutis caracteres morfológicos confiáveis (inúmeras vezes homoplásicos) para sustentar as monofilias dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008). Ainda, a descrição de novas espécies é problemática, onde caracteres morfológicos diagnósticos se sobrepõem. Exemplos deste fato pode ser dado pelas espécies *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon affinis*. Uma provável nova espécie de *Apareiodon* foi proposta a partir de análises citogenéticas (VICARI et al., 2006) para as cabeceiras do rio Tibagi, Ponta Grossa-PR. Esta espécie é mantida como *Apareiodon* sp. cf. *Apareiodon ibitiensis* devido a sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos. No mesmo sentido, *Apareiodon affinis* apresenta cariomorfos altamente diferenciados para populações do Alto Rio Paraná, Uruguai, Paraguai, Cuiabá, consistentes com a ausência de fluxo gênico; entretanto, sem diagnose morfológica para proposição de espécies diferentes (COELHO, 2014).

1.5 CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DA FAMÍLIA PARODONTIDAE

Análises citogenéticas tiveram um grande avanço nos últimos anos devido a utilização de técnicas mais resolutivas de análises cromossômicas, o que tem possibilitado um maior entendimento da estrutura e organização cromossômica como também tem contribuído efetivamente para estudos taxonômicos e filogenéticos dos

vertebrados. Estes avanços têm se refletido nos estudos citogenéticos de peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos (ARTONI et al., 2009).

Na família Parodontidae, estudos citogenéticos tem mostrado um número diploide conservado de 54 cromossomos, compostos basicamente por meta-submetacêntricos (m-sm), sendo os cromossomos subtelocêntricos (st) ausentes ou variando entre um a três pares entre as espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, GALETTIJUNIOR, 1993; BELLAFRONTE et al., 2011). No entanto, em populações de *A. affinis* do baixo rio Paraná (Argentina), rio Paraguai, rio Uruguai e rio Cuiabá ocorre a presença de cromossomos do tipo acrocêntrico (JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000; 2004; COELHO, 2014). Em *A. piracicabae* coletados no rio Passa Cinco – SP foram diagnosticadas variações de número cromossômico em Parodontidae, devido à presença de cromossomos B (FALCÃO; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1984). O gênero *Saccodon* é o único até o momento há não apresentar estudos citogenéticos em Parodontidae.

No entanto, uma série de características cromossômicas e genômicas não são compartilhadas por todos os representantes da família, tais como o sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, polimorfismo estrutural dos cromossomos, cromossomos supranumerários, variação inter e intraespecífica no número e posição das regiões organizadoras de nucléolo nos cromossomos e as diferenças interespecíficas na distribuição famílias de DNA satélite, número e localização de sítios de rDNA 18S e 5S, heterocromatina, localização e número de sítios do DNA satélite pPh2004 (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, GALETTIJUNIOR, 1980, 1984, 1993; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a, 2000b; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000, 2004; VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; VICENTE et al., 2003;

CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTE et al., 2005, 2009, 2011, 2012; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014).

Entre todos os Parodontidae já estudados citogeneticamente, os sítios ribossomais apresentam uma importante variação intergenérica, a qual auxilia na citotaxonomia das espécies (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTE et al., 2005). Entre representantes do gênero *Apareiodon*, os sítios de DNA ribossomais 45S, detectados por Ag-RONs e sonda de rDNA 18S, estão localizados na região terminal do braço longo de um par cromossômico subtelocêntrico grande (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JUNIOR, 1984, 1985; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009, 2011), e presença de sítios adicionais em *A. ibitiensis* e *A. vittatus* (BELLAFRONTE et al., 2009, 2011). A única exceção até o momento foi encontrada em *A. hasemani*, onde o rDNA 45S foi localizado em pares meta/submetacêntricos (BELLAFRONTE et al., 2012). Por sua vez, *A. piracicabae* mostra polimorfismo intra- e inter-individual relacionada com a ocorrência de RONS duplicadas em cada cromossomo de um par subtelocêntrico (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JUNIOR, 1984).

No gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie-específicos localizados em cromossomos metacêntricos e/ou submetacêntricos (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; CENTOFANTE; BERTOLLO; GALETTI JUNIOR, 2002; BELLAFRONTE et al., 2005, 2011). Entre os grupos de próxima relação filogenética à Parodontidae, na família Anostomidae as RONS foram localizadas na região terminal de um par

meta/submetacêntrico na maioria das espécies (GALETTIJUNIOR; CESAR; VENERE, 1991). No entanto, alguns estudos morfológicos e osteológicos apontam Hemiodontidae como grupo externo à Parodontidae (ROBERTS, 1974b). Em Hemiodontidae, na grande maioria das espécies, a localização das RONS é em posição terminal de um par subtelocêntrico, similar ao encontrado em *Apareiodon* (PORTO et al., 1993). Independente da condição ancestral do carácter posição da RON em Parodontidae, a movimentação de sítios de rDNA ocorreram na diversificação cariotípica do grupo (BELLAFRONTTE et al., 2011).

No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima a região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos, característica que é homóloga a encontrada na família Anostomidae (CENTOFANTE; BERTOLLO; GALETTI JUNIOR, 2002; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTTE et al., 2009, 2011; SCHEMBERGER et al., 2011), a exceção de *A. hasemani*, que apresenta rDNA 5S em posição subterminal de um par submetacêntrico. Ainda, não há localização destes sítios rDNA 5S em Hemiodontidae. Vicente; Jesus e Moreira-filho (2001) detectaram um maior e um menor conjunto de rDNA 5S em pares cromossômicos distintos de *P. hilarii*, *P. nasus* citado como *P. tortuosos* e *P. pongoensis*. A espécie *Parodon nasus* é a única à apresentar sintenia dos rDNAs 5S e 18S, característica apomórfica originada provavelmente por um evento de translocação cromossômica (BELLAFRONTTE et al., 2011).

A localização da heterocromatina é importante para identificação do sistema de cromossomos sexuais, incluindo o sistema ZZ/ZW de Parodontidae. Os blocos de heterocromatina em Parodontidae foram localizados nas regiões centroméricas e pericentroméricas, com evidentes marcações terminais em todas as espécies de Parodontidae analisadas (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI JUNIOR,

1984,1993; JESUS; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1999; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2004; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009, 2012).

Nas espécies que possuem sistema ZZ/ZW, a heterocromatina constitutiva, no cromossomo Z apresenta pequenos blocos heterocromáticos, sendo um proximal e outro terminal no braço curto. Entretanto, o cromossomo W sofreu um processo de heterocromatização e acúmulo de sequências repetitivas na diferenciação em relação ao cromossomo Z. A heterocromatização e o acúmulo de sequências repetitivas do W ocorreram a partir de uma pequena região heterocromática proximal do braço curto presente no cromossomo Z, a qual, no cromossomo W diferenciado é maior e corresponde ao braço longo. Esta hipótese de diferenciação é utilizada para explicar a origem evolutiva do sistema ZZ/ZW presente em *P. hilarii*, *P. moreirai* (citado como *Parodon* sp.), *A. vladii* (citado como *Apareiodon* sp.), *Apareiodon* sp. (localizado no rio Verde) e *A. ibitiensis* (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009; SCHEMBERGER et al., 2011). A exceção ocorre em *A. hasemani*, onde o acúmulo de heterocromatina (sequências repetitivas) no cromossomo W ainda é pequeno, o que deixa a região de diferenciação do cromossomo W localizada no braço curto, ao contrário dos demais representante onde esta região está localizada no braço longo (BELLAFRONTE et al., 2012).

Dados obtidos a partir de DNA satélite de Parodontidae mostraram a utilidade desse marcador em estudos evolutivos no grupo. Segundo vários autores, sequências de DNA satélite desempenham um papel importante na evolução de genomas porque eles estão envolvidos em rearranjos cromossômicos, e a rápida evolução destes fragmentos repetitivos promove movimentos intragenômicos entre cromossomos não-

homólogose diferentes domínios de cromossomos (WICHMAN et al., 1991; SLAMOVITS et al., 2001; VICARI et al., 2008, 2010; KANTEK et al., 2009; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014; PUCCI et al., 2014).

Em *Parodon hilarii* foi isolada e identificada uma família de DNA satélite utilizando o método de restrição genômica do DNA (VICENTE et al., 2003). Este DNA, denominado pPh2004, foi identificado como uma sequência monomérica de 200pb e composto 60% de bases AT. A hibridação *in situ* fluorescente, utilizando sonda deste satélite, evidenciou 16 sítios em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W de *P. hilarii* (VICENTE et al., 2003). A sonda pPh2004 também foi localizada em cromossomos de *Parodon moreirai* (CENTOFANTE; BERTOLLO, MOREIRA-FILHO, 2002) onde marcaram os mesmos sítios encontrados nos cromossomos Z e W de *P. hilarii*, além de dois pequenos sítios adicionais nos autossomos.

A localização do satélite pPh2004 em alguns representantes da família Parodontidae, evidenciou diferentes localização e número de sítios para *P. nasus*, *P. pongoensis*; *P. moreirai*; *P. hilarii*; *A. affinis* do Alto Rio Paraná (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011; COELHO, 2014). As espécies *A. ibitiensis*, *A. affinis* do Rio Uruguai, *A. vladii*, *A. piracicabae* não apresentaram marcações deste DNA satélite, assim pode-se inferir que as espécies que possuem o DNA satélite pPh2004 divergiram mais recentemente e são mais relacionadas (BELLAFRONTTE et al., 2011). Recentemente, Coelho (2014) encontrou 16 sítios do satélite pPh2004 distribuídos em cinco pares acrocêntricos e um subtelocêntrico na população de *A. affinis* do rio Cuiabá e; 18 sítios pPh2004 distribuídos em 8 pares acrocêntricos na

população desta espécie do rio Paraguai e; para *A. affinis* do rio Uruguai não foram observados sítios deste DNA satélite.

Sequências de DNAs repetitivos foram obtidas dos cromossomos sexuais da família Parodontidae pela microdissecção do cromossomo W de *Apareiodon* sp. submetido ao bandamento C seguido de uma amplificação pela PCR, utilizando iniciadores degenerados (DOP-PCR – *Degenerated Oligonucleotide Primed – Polimerase Chain Reacton*) (VICARI et al., 2010). Estes fragmentos de DNA repetitivos foram denominados de sonda WAp. A utilização desta sonda na FISH evidenciou sítios em regiões terminais de alguns cromossomos do cariótipo de todas as espécies da família Parodontidae estudadas (*Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*) além de marcações nos cromossomos sexuais em *A. affinis* que apresenta sistema de cromossomo sexual do tipo ZZ/ZW₁W₂ e; em todas as espécies com sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (SCHEMBERGER et al., 2011).

As marcações da sonda WAp nos cromossomos Z e W das espécies com sistema ZZ/ZW corroboram com a hipótese de que houve um acúmulo de sequências repetitivas para a derivação do cromossomo W (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009, 2011, 2012; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014). A sonda WAp também detectou marcações em regiões terminais de vários autossomos em todas as espécies analisadas, comprovando que esta sequência não é exclusiva dos cromossomos sexuais (SCHEMBERGER et al., 2011).

Além disso, com os resultados obtidos com a sonda WAp pode-se inferir uma possível origem dos cromossomos sexuais por um evento de inversão de sequências WAp de regiões terminais para a região proximal do braço curto de um par

metacêntrico, originando um par de cromossomos proto-sexuais (presente nas espécies *P. nasus* e *P. pongoensis*) seguido de acúmulo destas sequências na origem do cromossomo W heteromórfico (SCHEMBERGER et al., 2011). A localização *in situ* da sonda WAp em conjunto com o DNA satélite pPh2004 em Parodontidae permitiu a identificação de espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos (*A. piracicabae*, *A. vittatus*); com proto cromossomos sexuais e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. nasus* e *P. pongoensis*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (*Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii* e *A. hasemani*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. moreirai* e *P. hilarii*); além da espécie *A. affinis* (Alto Rio Paraná) com sistema de cromossomos sexuais múltiplos e DNA satélite pPh2004 apenas nos autossomos (SCHEMBERGER et al., 2011; BELLAFRONTE et al., 2012).

De modo semelhante, a utilização das sondas WAp e pPh2004 em *A. affinis* foi utilizada para explicar a origem do sistema sexual ZZ/ZW₁W₂, a qual considera a ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo translocação autossomo proto cromossomos sexuais portadores de DNA satélite pPh2004 (SCHEMBERGER et al., 2011). Posteriormente, rearranjos do tipo fissão cêntrica e inversão pericêntrica originaram os cromossomos W₁ e W₂ como proposto por Moreira-Filho; Bertollo e Galetti-Junior(1980).

Recentemente, um estudo de composição de sequências repetitivas presentes no cromossomo W de Parodontidae foi realizado (SCHEMBERGER et al., 2014). Neste trabalho foi possível verificar que a região pseudoautossômica (RPA) dos cromossomos sexuais é composta pelos braços longo do cromossomo Z e curto do cromossomo W, as quais possuem o DNA satélite pPh2004 no gênero *Parodon*. Na região específica do cromossomo W (REW) de Parodontidae foi possível verificar o

acúmulo de sequências satélites e de elementos transponíveis (TEs), as quais não são exclusivas dos sexuais. A localização proximal da REW é composta pelo DNA satélite (sat1WP). No terminal da REW foi visualizado um extensivo acúmulo do TE helitron e; em toda sua extensão, a REW é invadida por TEs degenerados de diferentes classes (SCHEMBERGER et al., 2014). Por fim, uma expansão do microsatélite (GATA)_n foi localizada na REW, em região intersticial (ZIEMNICZAK et al., 2015). Deste modo, a diferenciação molecular e a erosão da atividade gênica do cromossomo W ocorreu por acúmulos de sequências repetitivas de diferentes tipos e classes, as quais podem formar domínios na cromatina e ter uma relação com o controle da expressão dos genes presentes nos sexuais e determinação sexual.

1.6 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são frutos de um recente progresso da genética molecular, que gerou ferramentas e conhecimentos para estudos filogenéticos e populacionais, aumentando a capacidade de identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de ecossistemas, bem como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de diversas espécies (PAIVA; ROSA, 2009).

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (MATIOLI, 2001). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente de acordo com as leis básicas de herança descritas por Mendel e servem para identificar um local ou uma região de um cromossomo, a exceção de marcadores mitocondriais, que apresentam herança materna (ERICSSON et al., 2006).

As espécies não são homogêneas geneticamente, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). A separação geográfica, a capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e, comportamento de *homing* ou filopatria (tendência de retornar ao local de nascimento para reprodução) são os principais mecanismos que promovem o isolamento das populações (COUNCIL, 1996), as quais acumulam mutações diferenciais. A denominada “estrutura genética populacional” de uma espécie é reconhecida pelo padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). A identificação desta estrutura e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de técnicas morfológicas e moleculares (THUESEN et al., 2008) como a utilização de isozimas (ARON; SOLÉ-CAVA, 1991; GUSMÃO; LAZOSKI; SOLÉ-CAVA, 2000), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (MOYSÉS; ALMEIDA-TOLEDO, 2002), DNA arrays (HAJIBABAEI et al., 2007), polimorfismo de uma única base (*single-nucleotide polymorphism*- SNPs) (SHAFFER; THONSOM, 2007), sequências de DNA dos mais variados genes (POOK; MCEWING, 2005; LEMER et al., 2007), técnica de microssatélites (KEENEY et al., 2005), sendo a mais comum as de sequenciamento de segmentos do DNA mitocondrial, como o D-loop e genes da cadeia de transporte de elétrons (THUESEN et al., 2008).

Genes mitocondriais, possuem herança exclusivamente materna, além de apresentar padrão de herança não Mendeliana, ou seja, não sofrem eventos de recombinação, podem servir como marcadores moleculares. Esse marcador pode fornecer informações necessárias para estudos de relações filogenéticas, estimação

de distância genética, discriminação de subpopulações assim como investigar a história da biogeografia (ERICSSON et al., 2006; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

1.7 DNA BARCODE

Um importante projeto internacional conhecido como *DNA Barcoding of Life*, foi iniciado em 2003 pelo grupo de pesquisa de Paul Hebert, da Universidade de Guelph, com objetivode gerar uma biblioteca de acesso global, com sequências *barcode* de referência que permite pesquisadores identificar espécimes. O código de barras de um espécime (*barcode*) não identificados podem ser comparados com *obrcode* referência para encontrar as espécies correspondentes. Esta metodologia visa acelerar o ritmo de descoberta de espécies, permitindo a rápida classificação de espécimes e destacando taxa divergentes que podem representar novas espécies (HEBERT et al, 2003).

Em 2004, iniciou a organização internacional *Consortium for the BarCode of Life* (CBOL), dedicada ao desenvolvimento da metodologia do *DNA barcode* como padrão para identificaçãode espécies. Atualmente o CBOL conta com membros de 200 organizações de 50 países. Em 2007 foi criado o *The Barcode of Life Data System* (BOLD), um banco de dados para a organização, análise, armazenamento e manutenção das sequências de DNA barcode. O BOLD constitui-se numa plataforma de bioinformática integrada para dar suporte as fases de obtenção, análise e validação das sequências barcode (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

A metodologia consiste em gerar sequências, de aproximadamente 648pb, do gene mitocondrial citocromo C oxidase, subunidade 1, conhecido como COI. Este gene está presente em praticamente todos os organismos eucariotos como parte de

um complexo gênico codante de proteínas transmembranas, envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos (SIMON et al,1994; HEBERT et al, 2003; DOBLER; MULLER, 2000).

O gene COI vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva, além disso, são bastante conservados entre os mais diversos genomas e possuem suficiente diferenciação entre espécies por apresentarem padrão de sequência *barcode* espécie-específicos (TAUTZ et al., 2003; WILSON, 2003; BLAXTER, 2003; SCHINDEL; MILLER, 2005; RUBINOFF, 2006).

Outra característica relevante é que a variação genética observada entre indivíduos de uma mesma espécie (variação intraespecífica) é, na grande maioria dos casos, significativamente menor do que a variação genética encontrada entre espécies (variação interespecífica). Esta diferença cria um espaço entre os valores de variação genética intra e interespecíficas, chamado de “*barcode gap*”, contribuindo para a diferenciação entre as espécies (HEBERT et al.,2003, 2004; WAUGH, 2007; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008; WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

A utilização do COI é considerada vantajosa por ser suficientemente curto para ser sequenciado de forma rápida e barata contribuindo grandemente para identificar variações entre espécies e tem se mostrando altamente eficaz na identificação de pássaros, borboletas, aranhas, moscas, gastrópodes, anelídeos (FOLMER et al., 1994; REMIGIO; HEBERT, 2003; HEBERT et al., 2004; BARRETT; HEBERT, 2005; HAJIBABAEI; SINGER; HICKEY, 2006; CHANG; ROUGERIE; CHEN, 2009), incluindo peixes (WARD et al., 2005; HUBERT et al., 2008; PERSIS et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; BELLAFRONTE et al., 2013).

Exemplo disso, estudos realizados por Bellafronte et al. (2013) com sete espécies conhecidas e uma possível nova espécie de Parodontidae (*A. affinis*, *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vitattus*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp., *P. nasus* e *P. moreirai*) coletados em oito localidades distintas ao longo da bacia do rio Paraná, incluindo o Uruguai, Bacias do Paraguai e do Alto e Baixo Rio Paraná, mostraram que a metodologia de DNA *barcode* foi eficiente, permitindo a identificação correta das sete conhecidas e uma possível nova espécie de Parodontidae. Em alguns casos, a citogenética e a morfologia estão de acordo na caracterização de espécies, como *A. piracicabae*, *A. vladii*, *A. vitattus*, *P. moreirai* e *P. nasus*. Em outros, a citogenética é capaz de distinguir amostras a partir de uma espécie considerada por taxonomia como uma entidade única, por exemplo, amostras de *A. affinis*. Neste caso, o DNA barcode é de grande importância para a detecção das supostas espécies.

As análises destas sequências são realizadas utilizando o ClustalW (THOMPSON et al., 1994) o qual fornece um ambiente integrado para a realização de alinhamentos de múltiplas sequências e análise de seus resultados. O programa dispõe de recursos de cores e marcações permitem visualizar melhor os sítios conservados além de opções para o alinhamento múltiplo. A qualidade do alinhamento é verificada através da observação de histograma mostrado em sua base gráfica. O alinhamento obtido pode ser exportado e utilizado em outro programa de inferência filogenética.

As análises da distância genética entre as populações podem ser realizadas utilizando o programa MEGA 5.1. (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), o qual permite a comparação de sequências moleculares bem como a construção de árvores filogenéticas (KUMAR et al., 2008).

A distância genética é calculada baseando no modelo de evolução molecular Kimura-2-parâmetros (K2P). Este modelo apresenta um melhor desempenho quando as distâncias genéticas são baixas (KIMURA, 1980). Esta metodologia avalia a ocorrência de desigualdade entre as taxas de transição/transversão. Os dois parâmetros, α e β , permite variar não somente a taxa total de substituição por unidade de tempo, como também a fração dessas substituições que são transições e as que são transversões. Para qualquer nucleotídeo, pode haver uma troca a uma taxa α , o que causa uma transição, e a uma taxa β , que causa transversão. A razão de transição/transversão (R), será $\alpha/(2\beta)$. A taxa total de troca é de $\alpha+2\beta$.

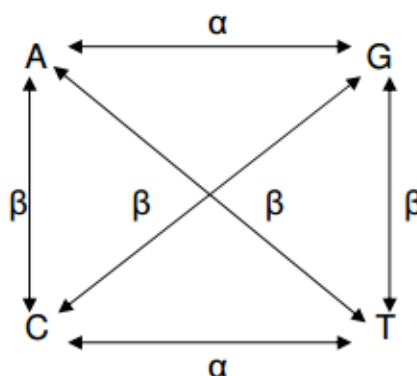


Figura 6. Esquema do modelo de Kimura-2-parameter

O modelo é simétrico e, após tempo suficiente, a probabilidade será a mesma de termos uma purina ou uma pirimidina na posição estudada. Para as quatro bases possíveis, teríamos, então, a probabilidade de 1/4 para cada uma delas. Para delimitar as espécies, o valor da divergência nucleotídica entre as espécies deve ser de pelo menos 10 vezes maior que o valor da média de divergência intraespecífica observada no grupo em estudo. Baseado em análises estatísticas, se uma espécime desconhecido apresentar um valor de divergência genética maior que 2% em relação a um espécime conhecido, esse espécime teria 95% de probabilidade de representar uma espécie diferente (HEBERT et al., 2004; WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

Para análise filogenética, pode ser realizada a construção de uma árvore enraizada para determinar quão perto ou distante nossa sequência de estudo se encontra de uma outra conhecida. Este tipo de árvore existe um nó particular, a raiz, para onde convergem todas as sequências e pode ser obtida se uma ou mais unidades taxonômicas operacionais (UTO), isto é, nó terminal ou taxa, formarem um grupo externo que se acredita estarem o mais distantemente relacionado às UTO do grupo interno. O nó raiz é aquele que agrupa o grupo interno e externo representando, deste modo, o ancestral comum de ambos.

Os dendrogramas são construídos a partir das 100 sequências que apresentaram maior homologia à sequência de interesse pelo método de Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). O método de NJ é empregado devido ao seu histórico de bom desempenho na análise de grandes conjuntos de dados e baseia-se no princípio de evolução mínima Cavalli-Sforza e Edwards (1967), identifica os vizinhos que sequencialmente minimizam o tamanho total da árvore (KUMAR; GADAGKAR, 2000; HEBERT et al., 2003). O primeiro passo é separar o par de UTOs mais próximo (a partir dos valores da matriz de distância), separando dos outros. Este procedimento é repetido até que todos os ramos sejam encontrados.

Como técnica de estimação de erros estatísticos, utiliza-se a análise de *bootstrap*, o qual é utilizado para medir o grau de suporte dos nós nas árvores filogenéticas pelo alinhamento das sequências. O valor de *bootstrap* representa o número de vezes que o agrupamento ocorre unas replicações. Um agrupamento tem um bom suporte se ocorrer em mais de 80% das árvores.

2 JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E METAS

A família Parodontidae apresenta relações filogenéticas controversas em relação a taxonomia por apresentarem poucos e sutis caracteres morfológicos confiáveis para sustentar as monofilias dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, e também para a diagnose de espécies (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008). No Alto Rio Paraná e São Francisco ocorre a espécie *Apareiodon ibitiensis* e em toda a bacia do rio Paraná é capturado *Apareiodon affinis*, ambas apresentam pequena variação morfológica entre populações distintas, porém com indícios de ocorrência de novos táxons. Vicari et al. (2006) com uso da citogenética propuseram uma possível nova espécie para a população do rio Verde, bacia do alto rio Tibagi, a qual é morfologicamente semelhante à *A. ibitiensis*. Por sua vez, *A. affinis* foi diagnosticado a apresentar quatro cariomorfos distintos: rio Uruguai – São Carlos-SC; rio Paraguai – Cáceres-MT; rio Cuiabá – Cuiabá-MT e; Alto Rio Paraná (COELHO, 2014). Com isso, a integração de estudos de número de cúspides nos dentes sinfiseanos, citogenéticos e de sequenciamento do COI podem ser úteis na resolução destas incertezas taxonômicas.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as incertezas taxonômicas decorrente da indicação de novas espécies em *A. ibitiensis* e *A. affinis* utilizando uma análise integrada de caracteres de número de cúspides em dentes sinfiseanos, caracteres citogenéticos e divergência nucleotídica para o marcador COI.

As metas deste trabalho foram:

- a) Caracterizar e comparar cariótipos de populações de *Apareiodon* sp. da bacia do rio Paranapanema e *Apareiodon ibitiensis* de outras localidades do sistema Alto Rio Paraná e São Francisco.

- b) Avaliar o número de cúspides nos dentes sinfiseanos das populações em estudo de *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. affinis* e *A. piracicabae*;
- c) Estimar a divergência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI) para as populações e espécies em estudo;
- d) Integrar os resultados obtidos para verificar a ocorrência de novas espécies do gênero *Apareiodon*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O estudo foi realizado com espécies da família Parodontidae. O material cromossômico e de DNA foi obtido do banco de preparações cromossômicas e tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa ou via coleta de peixes na natureza com licença do Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1 – Anexo 1). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 13/2014 – Anexo 2).

Neste estudo, a análise integrada utilizou espécimes adultos de quatro espécies e 12 diferentes populações. Estas populações foram diagnosticadas morfológicamente pela Dra. Carla Simone Pavanelli como sendo: *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *Apareiodon affinis* e *Apareiodon piracicabae*, sendo esta última utilizada como *in group* na análise de divergência nucleotídica (Tabela 1).

3.2 METODOLOGIAS

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada seguindo a técnica de preparações diretas de Bertollo; Takahashi; Moreira-Filho. (1978) - (Anexo 3) com modificações segundo Blanco et al. (2012) (Anexo 4). A detecção da heterocromatina constitutiva foi aplicada a técnica de bandeamento C, segundo Sumner, (1972) - (Anexo 5).

Como marcadores cromossômicos foram utilizadas as sondas do rDNA 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie

de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTIJUNIOR, 2004) e a sonda de rDNA 5S foi obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI JUNIOR, 1999), as quais foram submetidas ao procedimento de mini preparação plasmidial (kit “Illustra Plasmid Prep Mini Spin” (GE Healthcare) para recuperação das unidades ribossomais (Anexo 6).

Tabela 1: Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas. *Utilizado como *in group* na análise de divergência nucleotídica.

Espécies	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Nº de ♂	Nº de ♀	Total	Nº de registro
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde	Alto Tibagi / Paranapanema / Alto Paraná	14	12	26	3443
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio São João	Alto Tibagi / Paranapanema / Alto Paraná	8	11	19	16269
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Laranjinha	Alto Cinzas / Paranapanema / Alto Paraná	9	7	16	16868
<i>A. ibitiensis</i>	Rio Passa Cinco	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	5	4	9	16262
<i>A. ibitiensis</i>	Ribeirão Araras	São Francisco / São Francisco	5	6	11	32741 ¹
<i>A. affinis</i>	Rio Passa Cinco	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	16	15	31	31428 ²
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	12	8	20	13031.0 ³
<i>A. affinis</i>	Rio Paraná	Represa barragem de Itaipú /Paraná /Alto Paraná	13	14	27	16268
<i>A. affinis</i>	Rio Uruguai	Alto Uruguai / Uruguai / Baixo Paraná	9	8	17	16270
<i>A. affinis</i>	Rio Cuiabá	Alto Cuiabá / Alto Paraguai / Baixo Paraná	6	5	11	16265
<i>A. affinis</i>	Rio Paraguai	Alto Paraguai (Paraguai)	9	7	16	16263
<i>A. piracicabae</i> *	Rio Passa Cinco	Tietê (Alto Paraná)	4	2	6	16261

Nota: ¹exemplares do Museu Nacional do Rio de Janeiro; ²exemplares do Museu Nacional do Rio de Janeiro; ³exemplares do Museu de Zoologia da USP; os demais exemplares pertencem ao NUPELIA - Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura em Maringá.

A sonda do DNA ribossômico 18S foi marcada com biotina 16 dUTP por meio da reação de “Nick Translation” (Biotin Nick translation – Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante (Anexo 7). A sonda do rDNA 5S também foi marcada por reação de “Nick Translation”, desta vez utilizando a digoxigenina 11 dUTP (Dig Nick Translation, Roche Applied Science) – (Anexo 8).

As sondas de rDNA 18S e 5S foram utilizadas no procedimento de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) segundo o protocolo descrito por Pinkel; Straume e Gray

(1986), com modificações (Anexo 9). As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan; Fredga e Sandberg (1964).

A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994) – (Anexo 10). Os dentes foram posteriormente fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) em aumento 40x acoplado a câmara CCD DP71 (Olympus) e o software DP controller (Olympus).

A Extração de DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990) – (Anexo 11). Para obtenção das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI), utilizou os *primers* denominados de Fish F1 e Fish R1, segundo Ward et al. (2005) - (Anexo 12). As sequências obtidas foram purificadas seguindo o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) – (Anexo 13).

As sequências de DNA COI foram submetidas ao serviço de sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa ACT Gene Análises Moleculares (disponibilizado pela empresa Ludwig Biotec), utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequências COI individuais de cada espécie foram inicialmente analisadas utilizando o programa Bioedit 5.0.9 (HALL, 1999) e uma

sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA em cada espécie. Estas sequências serão depositadas no *Barcode of Life Data Systems* (BOLD). Todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW integrado ao programa Bioedit. O alinhamento obtido foi exportado e utilizado em outro programa de inferência filogenética (MEGA 5.1).

As análises da distância genética entre as populações foram realizadas com o programa MEGA 5.1. (Molecular evolutionary genetics analysis), o qual permitiu a comparação de sequências moleculares bem como a construção de árvores filogenéticas (KUMAR et al., 2008). A distância genética foi calculada utilizando o modelo Kimura-2-parametros (K2P) (KIMURA, 1980).

Para análise filogenética, foi realizada a construção de uma árvore enraizada para determinar quão perto ou distante nossa sequência de estudo se encontra de uma outra conhecida. Utilizamos duas espécies como “outgroup” *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* as quais são distantes de todas as outras espécies analisadas (considerado como possuindo um ancestral comum com todas as entidades) e *Apareiodon piracicabae* como “in group”.

O método utilizado para construção da árvore foi de Neighbor-joining (NJ) Saitou e Nei (1987). Como técnica de estimação de erros estatísticos, utilizou-se a análise de *bootstrap*, o qual é utilizado para medir o grau de suporte dos nós nas árvores filogenéticas pelo alinhamento das sequências. Esta análise é realizada pelo programa Mega 5.1, no momento da construção da árvore filogenética. O valor de *bootstrap* representa o número de vezes que o agrupamento ocorreu nas replicações.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em 2 capítulos correspondentes aos artigos científicos.

CAPÍTULO 1 (em preparação)

Diferenciação cromossômica, alta divergência genética e morfologia similar: O caso de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. (Characiformes: Parodontidae)

CAPÍTULO 2 (em preparação)

Incertezas taxonômicas em *Apareiodon affinis* (Characiformes: Parodontidae): uma análise integrada de dentes sinfiseanos, citogenética e DNA Barcode

4.1 CAPÍTULO 1

Diferenciação cromossômica, alta divergência genética e morfologia similar: o caso de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. (Characiformes: Parodontidae)

RESUMO

Parodontidae (Teleostei: Characiformes) reúne uma série de características exclusivas em relação as demais famílias da ordem. No entanto, a diagnose de espécies e a alocação destas nos gêneros é uma tarefa que deve ser realizada com intenso critério devido a semelhança morfológica entre pares de espécies e a ocorrência de uma série de caracteres que podem ser homoplásicos. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a divergência evolutiva entre o par de espécies *Apareiodon ibitiensis* e a denominada *Apareiodon* sp. Para isto, foi realizada uma análise integrada de contagem do número de cúspides dos dentes sinfiseanos, citogenética e de DNA *barcode*. Os resultados de análise do sequenciamento do gene citocromo c oxidase I (COI) permitiram demonstrar que *A. ibitiensis* da bacia do rio São Francisco é divergente de *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco (bacia do Tietê – Alto Rio Paraná), porém morfológicamente e citogeneticamente similares. No entanto, quando comparados *A. ibitiensis* ao *Apareiodon* sp. os dados citogenéticos e de marcador COI corroboram a existência de espécies divergentes. Desta forma, este estudo infere que neste par de espécies morfológicamente semelhantes, *A. ibitiensis* apresenta distribuição para a bacia do rio Tietê e propõem a distribuição de *Apareiodon* sp. restrita na drenagem do rio Paranapanema. Ainda, este estudo infere sobre o papel da diferenciação dos cromossomos sexuais na divergência evolutiva em parapatria de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp.

Palavras-chave: Citogenética, DNA *barcode*, evolução cariotípica, sistemática, taxonomia.

INTRODUÇÃO

Os peixes da família Parodontidae estão distribuídos por toda a América do Sul e parte do Panamá, são de pequeno porte (aproximadamente 15 cm) e diferenciados dos demais Characiformes por possuírem uma série de apomorfias: face ventral plana; lábio superior pouco desenvolvido ou ausente; dentes pré-maxilares frouxamente ligados ao osso pré-maxilar pelo lado posterior de seu pedúnculo; presença de lamelas ósseas separando as trincheiras de dentes do osso pré-maxilar e; os dentes mandibulares, quando presentes, localizados na região lateral da boca e direcionados para dentro da cavidade bucal (PAVANELLI, 1999; PAVANELLI, 2003; INGENITO; BUCKUP, 2005; PAVANELLI, 2006).

A família é constituída por um grupo relativamente pequeno de peixes neotropicais, com 32 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015), divididas em três gêneros: *Parodon*, *Saccodon* e *Apareiodon*. Apesar dos representantes da família serem facilmente diagnosticados em relação aos demais Characiformes, a morfologia e padrão de coloração relativamente homogêneo tem dificultado a diagnose das espécies e a alocação nos gêneros. Ainda, soma-se às incertezas taxonômicas o fato de serem diagnosticados por poucos caracteres, os quais geralmente são homoplásicos, como o número de raios nas nadadeiras peitorais, padrão dentário, número de cúspides pré-maxilares e padrão de coloração (PAVANELLI, 1999; PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008).

Nos parodontídeos os pequenos dentes com cúspides arredondadas presentes na pré-maxila têm sido utilizado na taxonomia das espécies. A contagem do número de cúspides é considerada um caráter confiável para diagnose de espécie entre *Parodon* e *Apareiodon*, não sendo utilizado em *Saccodon* por apresentar um grande polimorfismo dentário (GARAVELLO, 1977).

A taxonomia e sistemática de Parodontidae tem recebido contribuições da citogenética e genética molecular para a descrição de novas espécies (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006), indicação de sinonímia (BELLAFRONTTE et al., 2005) e agrupamento das espécies nos gêneros (BELLAFRONTTE et al., 2011, 2013; SCHEMBERGER et al., 2011). Os representantes da família apresentam um número diploide ($2n$) conservado de 54 cromossomos, compostos basicamente por meta-submetacêntricos (m-sm), sendo os cromossomos subtelocêntricos (st), quando presentes, variando entre um a três pares (BELLAFRONTTE et al. 2011). Além das diferenças interespecíficas de fórmula cromossômica, marcadores cromossômicos de DNA satélite e número e localização de sítios de rDNA são importantes para a análise evolutiva do grupo (SCHEMBERGER et al., 2011, 2014). Entretanto, a característica citogenética marcante neste grupo é a ocorrência de espécies sem heteromorfismo de cromossomos sexuais, espécies com proto cromossomos sexuais identificados e espécies com heteromorfismo de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, GALETTIJUNIOR, 1993; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a, 2000b; VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; VICENTE et al., 2003; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTTE et al., 2005, 2009, 2012; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014).

A espécie *Apareiodon ibitiensis* Amaral Campos, 1944 tem localidade tipo para o rio Camanducaia, afluente das nascentes do rio Piracicaba (Alto Rio Paraná), Monte Alegre do Sul – SP. Sua distribuição é descrita para toda a bacia do Alto Rio Paraná e bacia do rio São Francisco. Os primeiros estudos citogenéticos nesta espécie descreveram $2n = 54$ cromossomos sem heteromorfismo de cromossomos

sexuais (MOREIRA-FILHO et al., 1984, 1985; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a). Vicari et al. (2006) estudaram citogeneticamente uma espécie de *Apareiodon* para as nascentes do rio Tibagi, afluente do rio Paranapanema (Alto Rio Paraná – ver Figura 7), morfologicamente semelhante ao *A. ibitiensis*. Neste estudo diferenciaram a população do Alto Tibagi de *A. ibitiensis* pela presença do heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW (VICARI et al., 2006). Posteriormente, Bellafronte et al. (2009) reavaliaram populações de *A. ibitiensis* do rio São Francisco e rio Tietê (Alto Paraná) com metodologias mais resolutivas e evidenciaram um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, fato este que colocou em dúvida a existência da provável nova espécie para a região do Alto Rio Tibagi. Embora ocorra sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos entre *A. ibitiensis* em relação ao denominado *Apareiodon* sp. (Alto Rio Tibagi), a dúvida em relação a descrição do novo taxa permanece.

Marcadores moleculares também tem sido muito utilizado para estudos de relações filogenéticas permitindo caracterizar espécies e avaliar a variabilidade inter e intrapopulacional. O DNA barcode tem contribuído grandemente para estudos taxonômico por ser uma metodologia rápida e barata que consiste no sequenciamento de do gene mitocondrial citocromo C oxidase, subunidade I (COI), além disso apresentam padrão de sequência *barcode* espécie-específicos e são bastante conservados entre as mais diversificadas espécies (TAUTZ et al., 2003; WILSON, 2003; BLAXTER, 2003; SCHINDEL; MILLER, 2005; RUBINOFF, 2006).

Bellafronte et al. (2013) analisaram espécies de Parodontidae utilizando o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) e verificaram uma divergência genética de 4,2 % para *A. ibitiensis* (rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê, Alto Rio Paraná) e *Apareiodon* sp. do Alto Rio Tibagi. Desta forma, o objetivo deste estudo foi contribuir

na resolução da problemática das incertezas taxonômicas e avaliar a indicação de novas espécies em populações de *Apareiodon*, utilizando uma análise integrada de caracteres de número de cúspides em dentes sinfisianos, caracteres citogenéticos e divergência nucleotídica para o marcador COI.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Neste estudo, a análise integrada utilizou espécimes adultos de três espécies e seis diferentes populações de Parodontidae: *Apareiodon ibitiensis* do rio Ribeirão Araras - MG (5 machos e 6 fêmeas) e rio Passa Cinco - SP (5 machos e 4 fêmeas); *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha - PR (9 machos e 7 fêmeas), do rio São João - PR (8 machos e 11 fêmeas) e do rio Verde - PR (14 machos e 12 fêmeas) (Figura 7). Ainda, *Apareiodon piracicabae*, rio Passa Cinco - SP (4 machos e 2 fêmeas) foi utilizada como *in group* na análise de divergência nucleotídica. O material cromossômico e de DNA foi obtido do banco de preparações cromossômicas e tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa ou via coleta de peixes na natureza com licença do Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) (Anexo 1). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 13/2014) (Anexo 2).

Extração dos dentes sinfisianos e contagem das cúspides

A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Com auxílio de estereomicroscópio e uma agulha hipodérmica

foram retirados os dentes sinfiseanos dos exemplares de Parodontidae em análise. Os dentes foram fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) em aumento 40x para posterior contagem do número de cúspides.

Preparações cromossômicas

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada seguindo a técnica de preparações diretas de Bertollo; Takahash e Moreira-Filho. (1978) com modificações segundo Blanco et al. (2012). As preparações cromossômicas foram submetidas a coloração convencional por Giemsa e bandamento C (SUMNER, 1972) para determinar o número diploide, fórmula cromossômica e caracterizar o heteromorfismo de cromossomos sexuais.

Hibridação in situ fluorescente (FISH) e Sondas de rDNA

O procedimento geral da Hibridação *in situ* fluorescente(FISH) seguiu o descrito por Pinkel; Straume e Gray (1986). Foram empregados dois tipos de sondas para a localização dessas sequências nos cromossomos metafásicos das espécies de Parodontidae estudadas: (1) uma sonda de rDNA 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTIJUNIOR, 2004); (2) uma sonda de rDNA 5S, obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTIJUNIOR, 1999).

A sonda do DNA ribossômico 18S e 5S foram marcadas por meio de reação Nick Translation, com biotina e digoxigenina, respectivamente, com estringência de 77%. Os cromossomos foram contra corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - 0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

Obtenção das imagens e organização dos cariótipos

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels (Carl Zeiss®). Os cariótipos foram montados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan; Fredga e Sandberg (1964).

Obtenção das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI)

Para a obtenção das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI) foi realizada a extração de DNA genômico e mitocondrial a partir de tecidos sólidos (fígado e músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). A reação de amplificação da sequência COI foi realizada com a utilização dos *primers* denominados de Fish F1 e Fish R1 (WARD et al. 2005). A reação foi composta por 1x *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM *primers* e 50 ng/mL de DNA molde. O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 55,4 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 s e, extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados pelo Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare) e então submetidos ao sequenciamento de DNA.

Sequenciamento e análise das sequências COI

As sequências de DNA COI foram obtidas utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM *Genetic Analyzer*. Sequências COI individuais de 5 indivíduos de cada espécie foram inicialmente analisadas utilizando o programa Bioedit 5.0.9 (HALL, 1999) e uma sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA em cada espécime. Todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW integrado ao programa Bioedit 5.0.9 (HALL, 1999). A distância genética foi calculada utilizando o modelo Kimura-2-parameter (K2P) (KIMURA, 1980). As análises da distância genética e construção do dendograma utilizaram o programa MEGA 5.01 (TAMURA et al., 2011). Foi elaborado um dendograma Neighbor-joining (NJ) com as distâncias genéticas K2P melhor representar a divergência padrão e separação entre as espécies (SAITOU; NEI, 1987). Para determinar os limites de confiança nas ramificações, os dados foram submetidos ao teste de *bootstrap* (FELSENSTAIN, 1985) para 1000 replicações e os valores estão apresentados em porcentagem próximos aos ramos. As sequências das espécies que foram utilizadas como *outgroup*, *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau*, foram obtidas do *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (RATNASENGHAM; HEBERT, 2007). Todas as sequências obtidas serão depositadas no BOLD por ocasião da publicação do artigo.

RESULTADOS

Nas cinco populações de *Apareiodon* analisadas, a contagem do número de cúspides nos dentes sinfiseanos mostrou uma variação de 9 a 11 em *Apareiodon ibitiensis* das populações do Ribeirão Araras-MG e rio Passa Cinco-SP e; 10 a 11 em

Apareiodon sp. do rio Laranjinha-PR, 9 a 11 em *Apareiodon* sp. do rio Verde-PR e rio São João-PR (Figura 8).

A análise citogenética para as populações de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. evidenciaram um $2n = 54$ cromossomos, com heteromorfismo de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (Tabela 2, Figura 9). As populações de *A. ibitiensis* evidenciaram fórmula cromossômica de $50m/sm+4st$ para ambos os sexos, com cromossomo Z metacêntrico de tamanho médio e W submetacêntrico um pouco maior (Figura 9a, b). Por sua vez, as populações de *Apareiodon* sp. apresentaram fórmula cromossômica de $48m/sm+6st$ em machos e $47m/sm+7st$ para fêmeas. Esta diferença de fórmulas cromossômicas entre machos e fêmeas é devida a presença do cromossomo W st, maior em tamanho que o Z metacêntrico (Figura 9c, d, e).

A distribuição da heterocromatina nas populações analisadas de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. evidenciou blocos centroméricos em praticamente todos os cromossomos, e blocos terminais em alguns pares (Figura 9). O cromossomo Z apresentou pequenos blocos de heterocromatina terminal e proximal no braço curto, enquanto que o cromossomo W têm um acúmulo de banda C na região proximal do braço longo. Entretanto, o cromossomo W de *A. ibitiensis* detém uma extensão menor de heterocromatina no braço longo quando comparado às populações de *Apareiodon* sp., onde o cromossomo W é maior em tamanho e subtelocêntrico (Figura 9). A análise de dupla FISH com sondas de rDNA 5S e rDNA 18S para as populações de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. evidenciou um par cromossômico portador do rDNA 5S, sendo localizado na região intersticial do braço curto do par submetacêntrico 9 em *A. ibitiensis* e par submetacêntrico 11 nas populações de *Apareiodon* sp. (Tabela 2, Figura 10). Já os sítios rDNA 18S foram múltiplos em *A. ibitiensis* do Rio Passa Cinco-SP e localizados na região terminal dos pares 6, 14 e 15 submetacêntricos e 26

subtelocêntrico (Tabela 2, Figura 10a). Por sua vez, *A. ibitiensis* do Rio Ribeirão Araras-MG evidenciou dois pares portadores do sítio, localizados na região terminal dos pares 14 submetacêntrico e 26 subtelocêntrico (Tabela 2, Figura 10b). Em *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha foram localizados dois pares portadores do rDNA 18S, sendo eles o 14 submetacêntrico e 25 subtelocêntrico (Tabela 2, Figura 10c). Em *Apareiodon* sp. dos rios São João e Verde o rDNA 18S foi localizado apenas na região terminal do par subtelocêntrico 25 (Tabela 2, Figura 10d,e).

A análise das sequências COI obtidas de cinco espécimes de cada população/espécie estudada apresentaram uma variação entre 659 a 708 pb. As sequências obtidas foram de alta qualidade e a sequência consenso de cada grupo não mostrou evidência de inserções, deleções ou códons de parada. A média de divergência genética K2P, dentro das espécies foi de 0,43% e a interespecífica foi de 6,06%.

A divergência genética K2P entre o par *A. ibitiensis* do Ribeirão Araras (bacia do São Francisco) e rio Passa Cinco (bacia do Tietê) foi de 3,69%. Por sua vez, a divergência genética K2P entre as populações de *Apareiodon* sp. foram de: rio Laranjinha x rio São João (0,93%); rio Laranjinha x rio Verde (1,07%) e; rio Verde x rio São João (0,76%) (Tabela 3). Já a divergência nucleotídica K2P entre o par *A. ibitiensis* do ribeirão Araras e rio Passa Cinco comparados ao *Apareiodon* sp. (rios Laranjinha, São João e Verde) foi em média 4,39% (Tabela 3). Quando comparados *A. ibitiensis* do Ribeirão Araras aos *Apareiodon* sp. (rios Laranjinha, São João e Verde) a divergência K2P média foi de 3,91% (Tabela 3) e; entre *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco e *Apareiodon* sp. (rios Laranjinha, São João e Verde) foi de 4,87% (Tabela 3). Comparando as populações de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. ao ingroup *A. piracicabae* a divergência K2P média foi de 11,60% (Tabela 3).

Análise do dendograma evidenciou três ramos bem consistentes: *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco; *A. ibitiensis* do ribeirão Araras e; o terceiro com as três populações de *Apareiodon* sp. (rios Laranjinha, São João e Verde), com valores de Bootstrap de clados variando de 74% a 99% (Figura 11). Por sua vez, a espécie *A. piracicabae*, utilizada como in group, ficou situada em outro ramo, com valores de *bootstrap* de 99% e; as espécies *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau*, representantes da família Hemiodontidae e Anostomidae, respectivamente, as quais foram utilizadas como grupo externo para enraizamento da árvore, mostrou possuir um ancestral comum com todas as espécies analisadas, se situando fora do grupo de interesse (Figura 11).

DISCUSSÃO

Análises citogenéticas tradicionalmente tem cooperado com a taxonomia e a sistemática de Parodontidae (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTE et al., 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). Estudos morfológicos realizados com *Apareiodon ibitiensis* (rio Passa Cinco) e *Apareiodon* sp. (rio Verde) não obtiveram caracteres diagnósticos suficientes para separação das espécies (INGENITO, 2008). A principal diferença encontrada em *Apareiodon* sp. (rio Verde) é a presença do inter-hial grande versus (inter-hial) ausente ou pequeno em *A. ibitiensis* (INGENITO, 2008). O padrão de coloração é outra característica utilizada para diagnose de espécies em Parodontidae (PAVANELLI, 2003, 2006). No entanto, todos os exemplares das populações analisadas neste estudo apresentaram padrão de coloração homogênea, não sendo úteis para discriminar as espécies.

Estudos antigos de revisão taxonômica nos gêneros *Parodon*, *Saccodon* e *Apareiodon* utilizaram amplamente a diagnose de número de cúspides dos dentes sinfiseanos para a identificação de espécies (GÉRY, 1959; ROBERTS, 1974a;

GARAVELLO, 1977). Os resultados do número de cúspides dos exemplares avaliados no presente estudo corroboram com Moreira-Filho e Garavello (1994), onde encontraram para *A. ibitiensis* de 8 a 11 cúspides nos dentes sinfiseanos. Ainda, a análise dos dentes sinfiseanos mostrou sobreposição do número de cúspides nas cinco populações avaliadas, evidenciando ausência de divergência evolutiva para esta característica entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp.

A separação de espécies utilizando caracteres morfológicos em Parodontidae, os quais podem ser homoplásicos, deve ser realizada com precaução (PAVANELLI, 2003, 2006; INGENITO, 2008). Estes caracteres diagnósticos em Parodontidae, em sua maioria, são de herança contínua e provavelmente controlados por genes *Hox*, os quais controlam a morfogênese a diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário normal de animais o que torna mais difícil a identificação específica na família (BURKE et al., 1995). As alterações que possam inibir ou super-expressar genes homeóticos – *Hox* poderão resultar em diferenças morfológicas, as quais dificultam a separação das espécies (FREEMAN; HERRON, 2009).

Estudos citogenéticos realizados por Vicari et al. (2006) propuseram a ocorrência de uma nova espécie para o gênero *Apareiodon* para a população do Alto Rio Tibagi (rio Verde), morfológicamente semelhante à *A. ibitiensis*, mas que apresentavam características cromossômicas divergentes. No presente estudo, as análises cromossômicas em diferentes populações de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. evidenciaram um número conservado de $2n=54$ cromossomos, no entanto, com diferenciação na fórmula cromossômica, morfologia e tamanho do cromossomo sexual W entre as duas espécies, permitindo uma identificação citogenética específica.

A diferença no tamanho do cromossomo sexual W entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. pode ser constatada também com a análise da distribuição da heterocromatina. As duas espécies possuem blocos heterocromáticos pericentroméricos em todos os autossomos e, algumas bandas terminais. Entretanto, quando visualizada a extensão do bloco heterocromático no braço longo de cromossomo W, as populações de *Apareiodon* sp. apresentam uma maior quantidade e tamanho de heterocromatina quando comparadas à população de *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco e Ribeirão Araras. Casos de diferenças de amplificação dos blocos heterocromáticos no cromossomo sexual também foram visualizados em peixes do gênero *Poecilia*, onde o tamanho da região heterocromática do cromossomo Y difere acentuadamente entre linhagens (NANDA et al., 2014).

Em Parodontidae, os estudos de composição de DNA do braço longo do cromossomo W evidenciaram que esta região é composta por repetições em tandem e elementos transponíveis (TEs) (SCHEMBERGER et al., 2014, ZIEMNICZAK et al., 2015). Nesta região do braço longo, os principais acúmulos de DNAs repetitivos são para o satélite WAp1, o minissatélite (GATA)_n e os TEs Tc1-Mariner e Helitron, os quais apresentam características estruturais e funcionais para o heteromorfismo do cromossomo sexual (SCHEMBERGER et al., 2014, ZIEMNICZAK et al., 2015). Em espécies do gênero *Poecilia* foi sugerido que o padrão de coloração corpóreo ligado aos cromossomos sexuais e outros genes sexualmente selecionados são importantes para a manutenção do polimorfismo heterocromático estrutural dos cromossomos sexuais entre linhagens (NANDA et al., 2014). Neste sentido, é provável que o acúmulo diferencial de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais tem proporcionado diferenças estruturais e evolutivas entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp., bem como, atuam na supressão da recombinação da região determinante sexual.

Recentemente, o papel da supressão da recombinação entre os elementos do par cromossômico sexual tem sido avaliado para a especiação (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009; MACAYA-SANZ et al., 2011). A supressão da recombinação facilita o acúmulo de ‘genes da especiação’ nos cromossomos sexuais e 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; PUCCI et al., 2014). Nesta via, a diferença de tamanho da região específica do W visualizada entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. deste estudo poderia influenciar na evolução rápida dos genes ligados ao sexo, no acúmulo não aleatório de mutações e de genes, na exposição de genes recessivos incompatíveis em híbridos e, na taxa de recombinação (Para uma revisão ver, QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Ainda, segundo Qvarnström e Bailey (2009), estes fatores influenciam no isolamento sexual por codificar características com efeito de valor adaptativo sexo específico (características sexuais primárias e secundárias) em diferentes fases do processo de especiação. Desta forma, nós propomos que a restrição ao fluxo gênico entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. sem a ocorrência de barreiras geográficas pode ter sido auxiliada pela rápida diferenciação dos cromossomos sexuais.

Marcadores cromossômicos de localização *in situ* de rDNAs têm sido utilizados na citotaxonomia (VICENTE; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2001; BELLAFRONTE et al., 2005; VICARI et al., 2008). Entretanto, algum cuidado deve ser requerido para a análise destes marcadores. Estes genes de rRNA podem ter seus rearranjos nos cariótipos devido a associação com TEs (da SILVA et al., 2011; SYMONOVÁ et al., 2013) e desta forma a organização dos *cluster* gênicos de rRNA podem refletir sua

intensa e particular rota de modificação evolutiva, e não a história evolutiva das espécies associadas em alguns grupos de peixes (NAKAJIMA et al., 2012). Ainda, Symonová et al. (2013) propuseram que os genes de rRNA em algumas espécies podem utilizar o mecanismo de aumentar em cópias e transposição dos TEs e, subsequentemente afetar as taxas de recombinação em genomas próximos, assim, levando a rápida divergência genômica. Para as populações de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. avaliadas, os sítios de rDNA 5S se mantiveram conservados em posição proximal do braço curto de um par metacêntrico. Já os sítios de rDNAs 18S apresentaram variação em número entre o par de espécies. *Apareiodon* sp. apresentou menor número de sítios rDNA 18S em suas populações enquanto que *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco apresenta quatro pares com sítios rDNA 18S. Esses dados reforçam a divergência evolutiva entre *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. e provável restrição ao fluxo gênico mesmo sem o isolamento geográfico.

O isolamento genético entre as populações/espécies também foi demonstrado neste estudo com as análises de DNA *barcode*. As populações identificadas morfológicamente como *A. ibitiensis* dos rios Passa Cinco, bacia do Tietê – Alto Paraná, e ribeirão Araras, bacia do São Francisco (Figura 7) apresentaram uma divergência genética K2P de 3,69%, sustentadas em ramos diferentes (Figura 11). Estudos realizados por Bellafronte et al. (2013) com DNA barcode mostrou a baixa divergência interespecífica entre *A.piracicabae* e *A. vittatus* (0,9%) e *P. moreiraie* *P. nasus* (0,7%). Apesar de baixo, esses valores foram suficientes para discriminar as espécies devido a divergência nucleotídica, caracteres morfológicos e características cromossômicas. Em contrapartida, no presente estudo verificamos uma situação contrária onde as populações de *A. ibitiensis* dos rios Passa Cinco e ribeirão Araras, apresentaram valores de divergência genética altos, sem a sobreposição de

haplótipos, suficientes para a proposição de espécies divergentes, no entanto apresentaram características morfológicas e citogenéticas muito semelhantes.

Por sua vez, quando analisamos a diferenciação para populações identificadas como *Apareiodon* sp. de três diferentes afluentes que compõem a bacia do Paranapanema (rios Laranjinha, São João e Verde), a divergência genética K2P média foi de 0,93%, indicando a ocorrência de fluxo gênico, o qual também é visualizado com a parafilia dos haplótipos na análise de dendograma (Figura 11). Este resultado é reforçado pelas análises morfológicas e citogenéticas que agrupam estas três populações. No entanto, quando comparamos os dados de DNA barcode destas três populações de *Apareiodon* sp. da bacia do rio Paranapanema às populações identificadas como *A. ibitiensis* observamos uma divergência genética compatível com a ocorrência de espécies distintas. Estes dados corroboram os estudos de Vicari et al. (2006) que propõem uma nova espécie de *Apareiodon* para a região do Alto Rio Tibagi e amplia a área de distribuição desta espécie para a bacia do rio Paranapanema.

As populações de *A. ibitiensis* (rio Passa Cinco – bacia do Tietê) e *Apareiodon* sp. (rios Laranjinha, São João e Verde – bacia do Paranapanema) são pertencentes ao sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná (Figura 7). Desta forma, considerando a existência deste par de espécies, as quais não possuem isolamento geográfico, é provável que a especiação em parapatría possa ter sido auxiliada por genes que codificam para características de isolamento sexual, os quais são mais efetivos em causar a esterilidade do híbrido quando ligados aos cromossomos sexuais (QVARNSTRÖN; BAILEY, 2009). Corrobora esta hipótese o fato dos cromossomos sexuais de *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. possuírem níveis diferenciados de acúmulo de sequências repetitivas. Assim, este estudo propõe a ocorrência de espécies crípticas para *A. ibitiensis* da bacia dos rios São Francisco e Tietê quando comparados

ao *Apareiodon* sp. avaliado para a bacia do rio Paranapanema. Ainda, é provável que a diferenciação dos cromossomos sexuais neste par de espécies, os quais estão em estágios diferentes de degeneração molecular da região específica do cromossomo W, possa ter contribuído para a divergência genética.

Tabela 2. Fórmula cariotípica e sítios de rDNA 5s e 18s de *Apareiodon* sp. e *Apareiodon ibitiensis* das localidades estudadas.

Espécie	Localidade	Fórm. cariotípica	Sítios rDNA 5S	Sítios rDNA 18s
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Passa Cinco	50m/sm+4st♂ e ♀	9 sm	6, 14 e 15 sm, 26st
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Ribeirão Araras	50m/sm+4st♂ e ♀	9 sm	14 sm, 26st
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Laranjinha	48m/sm+6st♂ 47m/sm+7st♀	11 sm	14 sm, 25st
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio São João	48m/sm+6st♂ 47m/sm+7st♀	11 sm	25 st
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde	48m/sm+6st♂ 47m/sm+7st♀	11sm	25st

Tabela 3. Divergência nucleotídica Kimura-2 parameter entre as espécies de *Apareiodon ibitiensis* das populações do ribeirão Araras e rio Passa Cinco e; *Apareiodon* sp., populações dos rios Laranjinha, São João e Verde.

	<i>Apareiodon</i> sp. Rio Verde	<i>Apareiodon</i> sp. Rio São João	<i>Apareiodon</i> sp. Rio Laranjinha	<i>A. ibitiensis</i> Rio Passa Cinco	<i>A. ibitiensis</i> Rio Ribeirão Araras	<i>A. piracicabae</i> Rio Passa Cinco
<i>Apareiodon</i> sp. - Rio Verde	0,9%					
<i>Apareiodon</i> sp.- Rio São João	0,76%	0,6%				
<i>Apareiodon</i> sp. - Rio Laranjinha	1,07%	0,93%	0,9%			
<i>A. ibitiensis</i> - Rio Passa Cinco	5,01%	4,85%	4,76%	0,2%		
<i>A. ibitiensis</i> –Rio R. Araras	4,06%	3,86%	3,82%	3,69%	0,0%	
<i>A. piracicabae</i> – Rio Passa Cinco	12,25%	12,03%	11,91%	10,61%	11,24%	0,1%

Nota: Para calcular a média de divergência nucleotídica utilizou-se os valores destacados na tabela. Para comparar *Apareiodon* sp. dos rios Verde, São João e Laranjinha com *Apareiodon ibitiensis* do rio Passa Cinco utilizou-se os valores em amarelo. Para *Apareiodon* sp. dos rios Verde, São João e Laranjinha comparado com *Apareiodon ibitiensis* do Ribeirão Araras utilizou-se os valores destacados em pink. Para as populações *Apareiodon* sp. comparada com as de *Apareiodon ibitiensis* utilizou os valores em amarelo e pink. Para a média entre *Apareiodon piracicabae*, *Apareiodon* sp. e *Apareiodon ibitiensis* utilizou-se os valores destacados em azul.

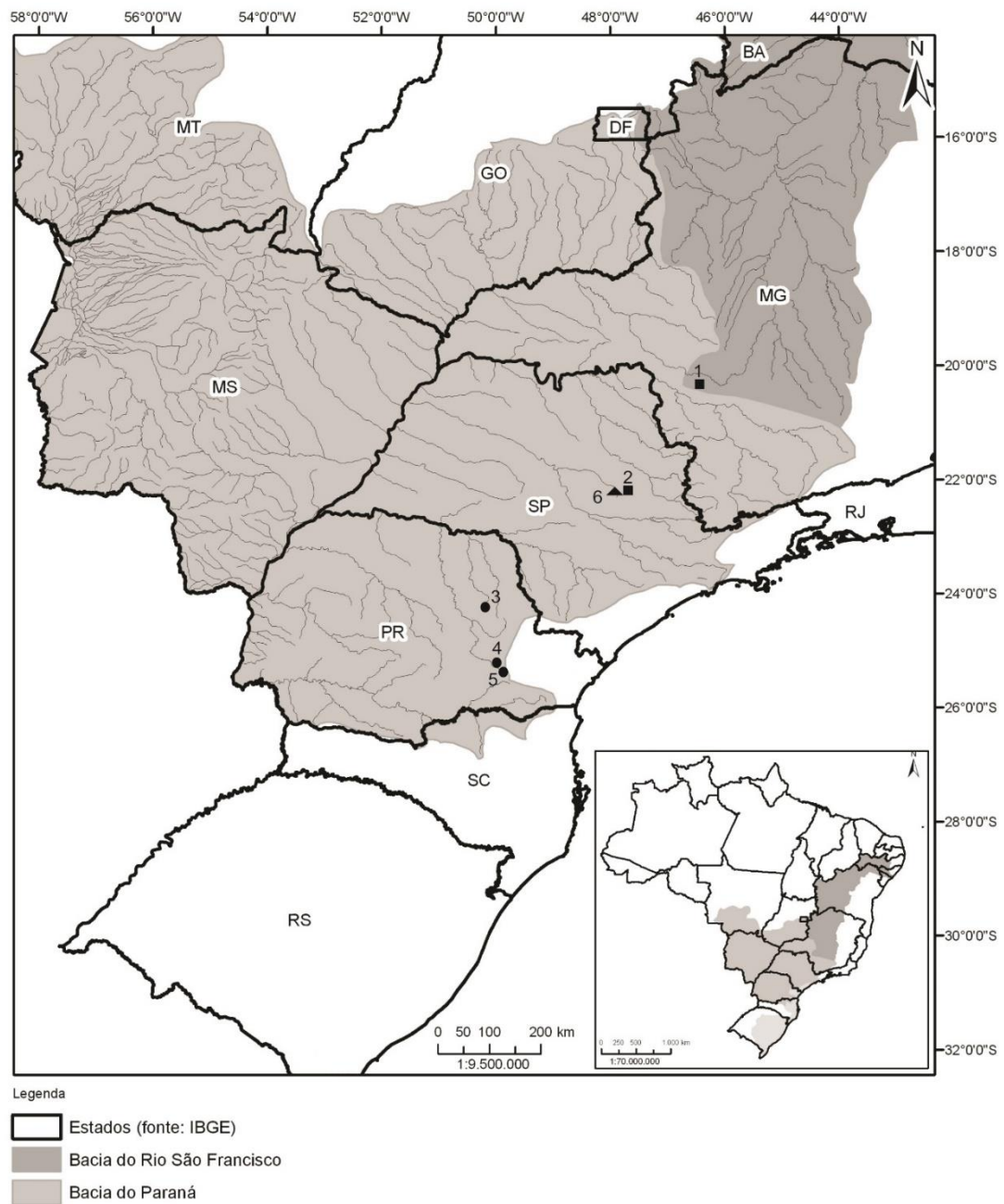


Figura 7. Mapa parcial do Brasil com as divisões das bacias hidrográficas do Alto Rio Paraná e Rio São Francisco. Os pontos representam os locais de amostragem. Os quadrados representam *Apareiodon ibitiensis*, em (1) ribeirão Araras, bacia do rio São Francisco e (2) rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê (Alto Rio Paraná). Os círculos representam locais de amostragem de *Apareiodon* sp., em (3) rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas-Paranapanema (Alto Paraná); (4) rio São João e (5) rio Verde, ambos da bacia do rio Tibagi-Paranapanema (Alto Paraná). O triângulo (6) representa o local de amostragem de *Apareiodon piracicabae*, rio Passa Cinco, bacia do rio Tietê (Alto Rio Paraná).

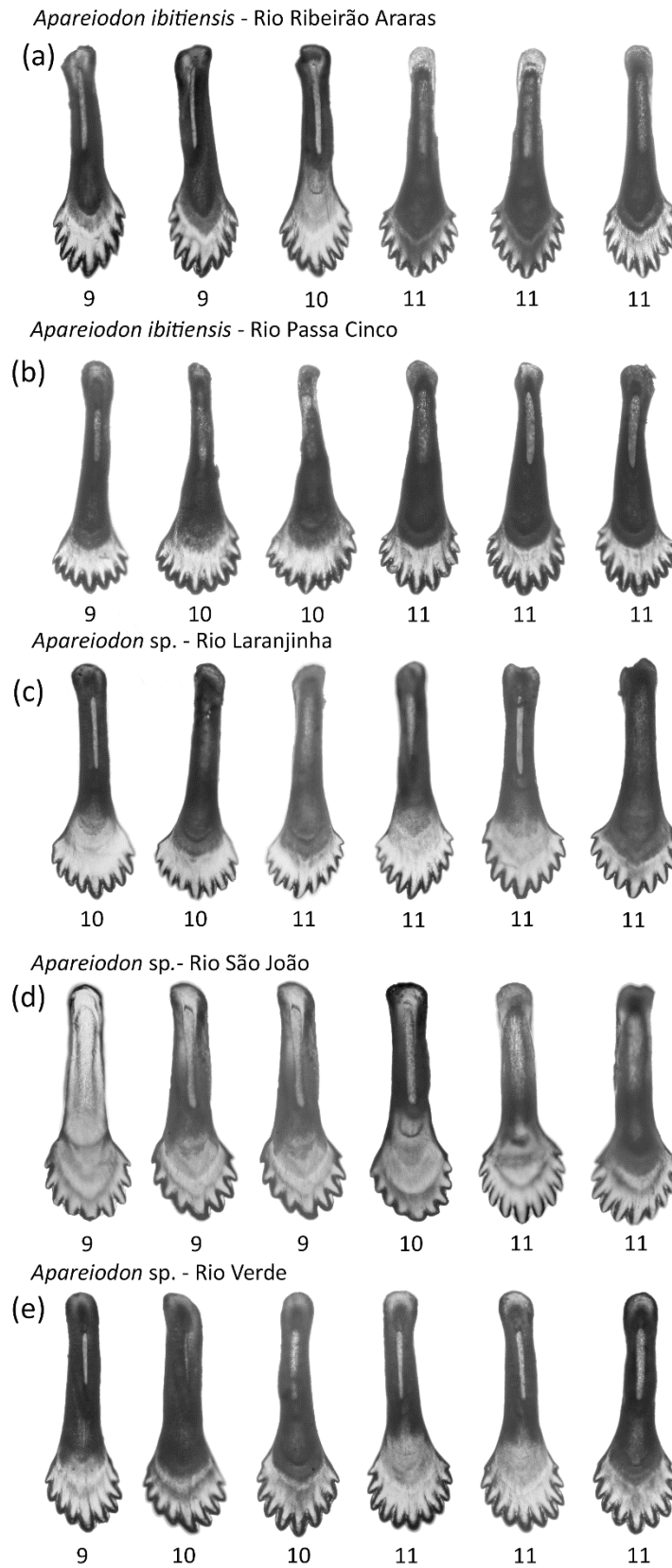


Figura 8. Fotos dos dentes sinfiseanos de cinco populações do gênero *Apareiodon* evidenciando a variação do número de cúspides. Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do ribeirão Araras; (b) rio Passa Cinco; (c) *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha; (d) rio São João e; (e) rio Verde. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.

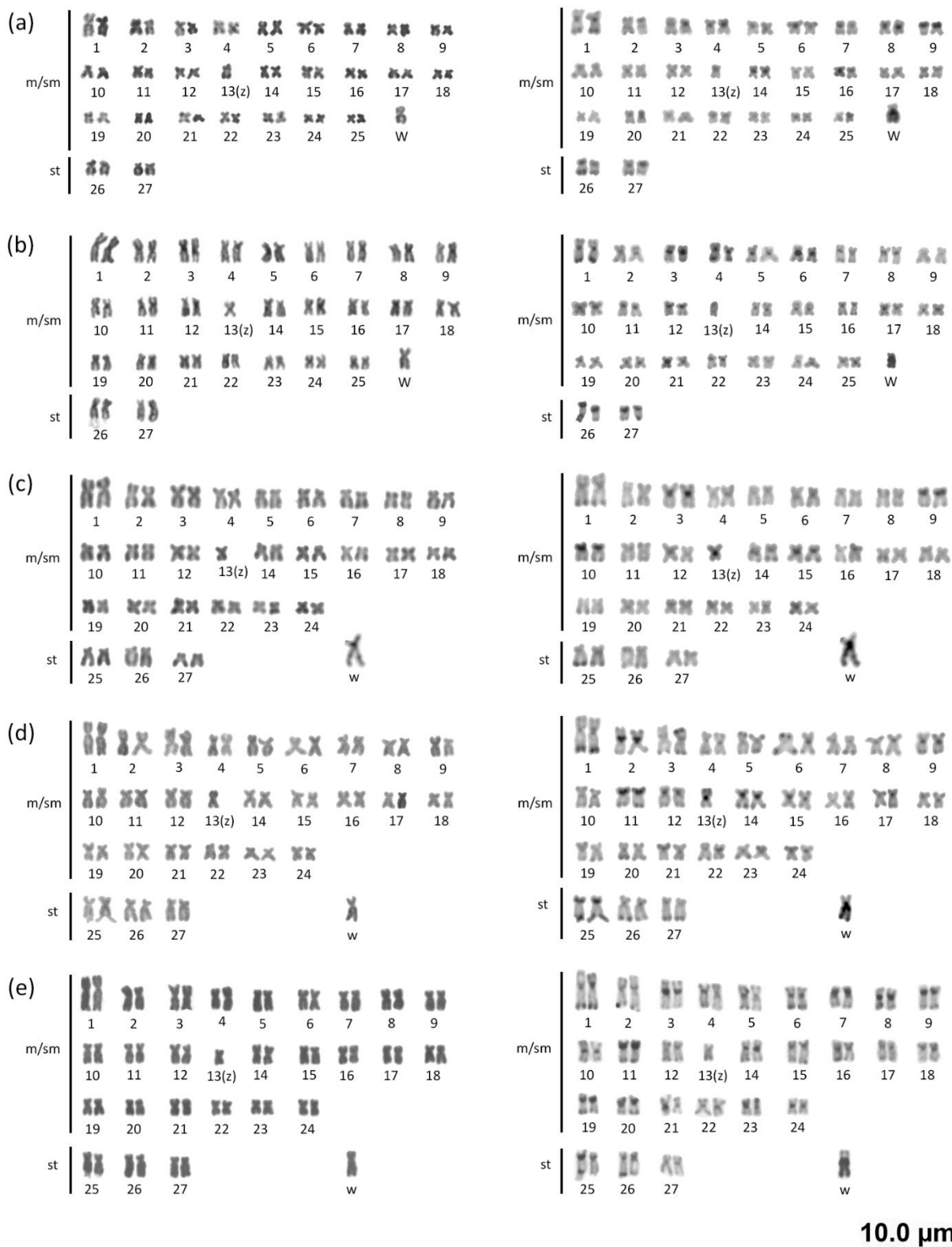


Figura 9. Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. em coloração convencional por Giemsa e bandamento C. Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do rio Passa Cinco, bacia do rio Tiete; (b) *Apareiodon ibitiensis* do Rio Ribeirão Araras, bacia do São Francisco; (c) *Apareiodon* sp. do rio Laranjinha, bacia do rio Paranapanema; (d) *Apareiodon* sp. do rio São João e; (e) *Apareiodon* sp. do rio Verde, ambos da bacia do rio Tibagi-Paranapanema. Barra = 10 μm.

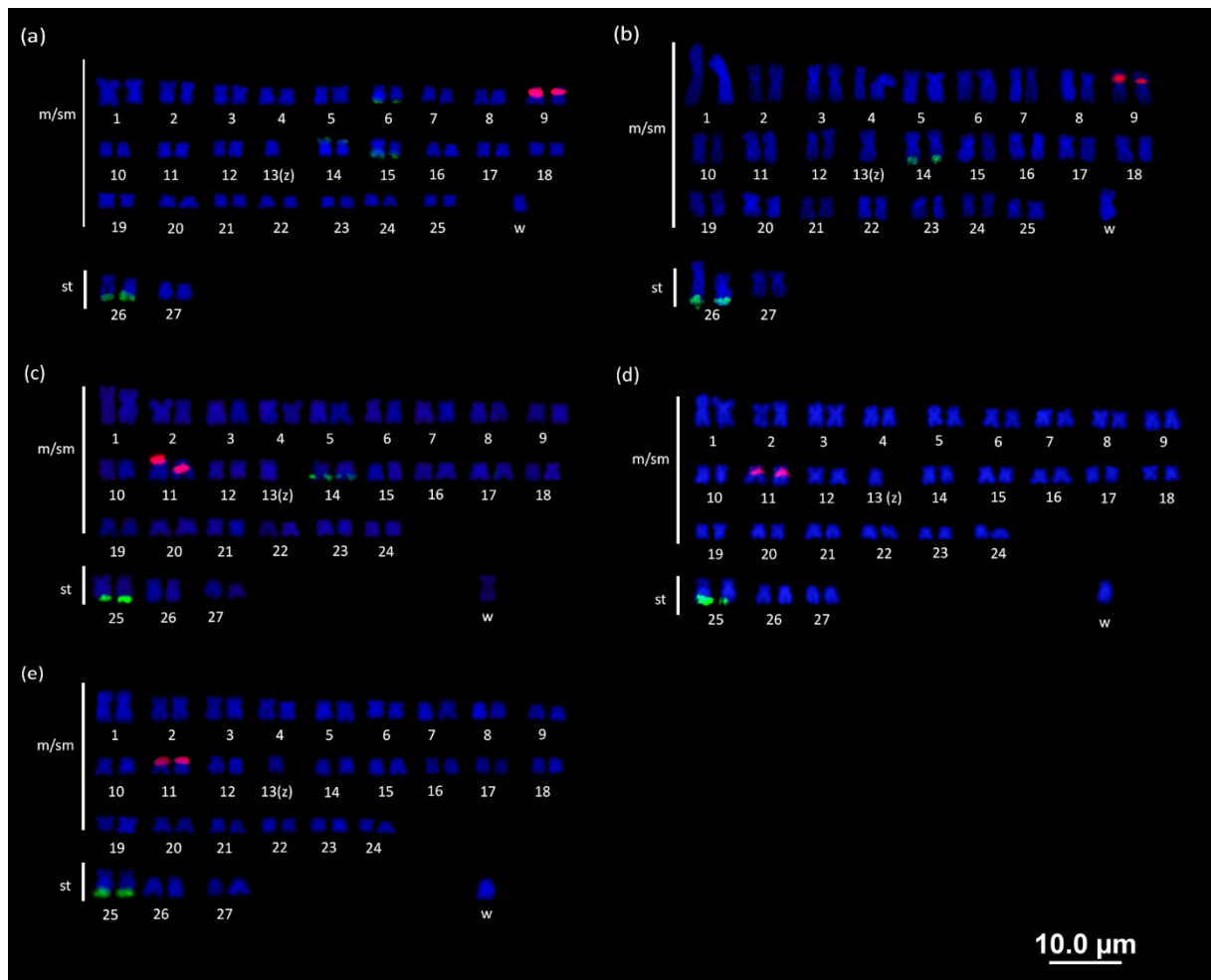


Figura 10. Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. submetidos a dupla FISH com sondas de rDNA 5S (vermelho) e rDNA 18S (verde). Em (a) *Apareiodon ibitiensis* do rio Passa Cinco; (b) *Apareiodon ibitiensis* do Rio Ribeirão Araras; (c) *Apareiodon* sp. do rio rio Laranjinha; (d) *Apareiodon* sp. do rio São João e; (e), *Apareiodon* sp. do rio Verde. Barra = 10 μm .

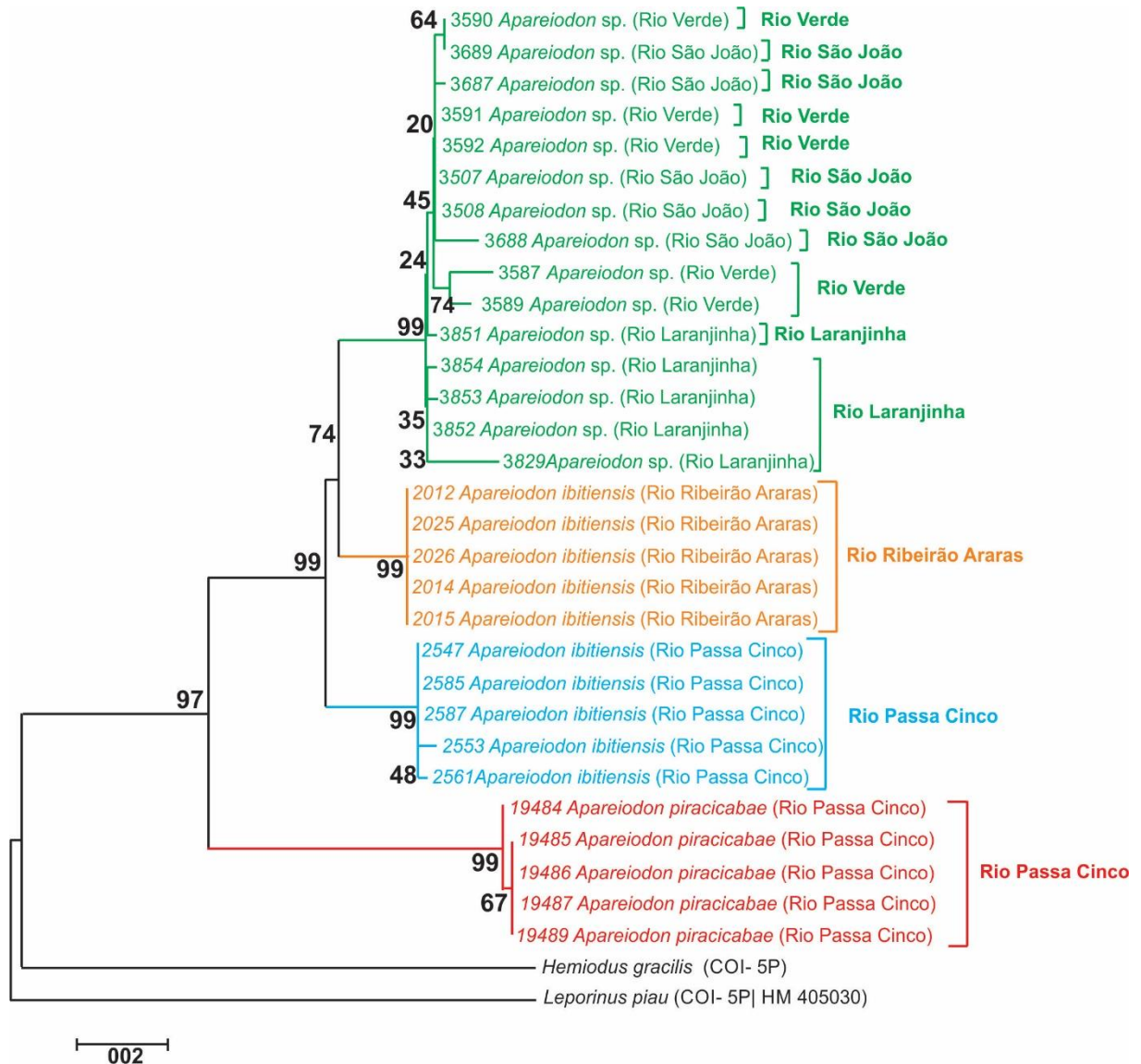


Figura 11. Dendrograma de Neighbor-Joining, mostrando todas as espécies dos rios analisados juntamente com as espécies *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* as quais que foram utilizadas como outgroup. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por bases.

4.2 CAPÍTULO 2

Incertezas taxonômicas em *Apareiodon affinis* (Characiformes: Parodontidae): uma análise integrada de dentes sinfiseanos, citogenética e DNABarcode

RESUMO

A sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos e a identificação de pares de espécies próximas é problemática para peixes da família Parodontidae. *Apareiodon affinis* e *A. piracicabae* são próximas morfologicamente, mas apresentam organizações cariotípicas divergentes. Além disto, estudos prévios identificaram diferenças cariotípicas consistentes com a restrição ao fluxo gênico entre populações de *A. affinis*, as quais foram utilizadas para propor a ocorrência de um complexo de espécies. Diante destas incertezas taxonômicas este estudo realizou uma comparação de dentes pré-maxilares (sinfiseanos), citogenética e de DNA *barcode* para seis populações de *A. affinis* e uma população de *A. piracicabae* buscando avaliar a divergência evolutiva entre as populações/espécies. Os resultados evidenciaram que *A. piracicabae* possui resultados citogenéticos e de DNA *barcode* consistentes para manutenção do táxon, embora possua morfologia similar à *A. affinis*. A comparação genética de *A. affinis* corroboram a ocorrência de uma unidade evolutiva divergente para as populações do Alto Rio Paraná, as quais demonstraram possuir fluxo gênico. Já as populações de *A. affinis* do Baixo Rio Paraná mostraram organizações cariotípicas divergentes, porém divergência nucleotídica do gene citocromo c oxidase I (COI) baixa, além da sobreposição dos caracteres morfológicos. Desta forma, para *A. affinis* do Baixo Rio Paraná foi proposto a estruturação genética das populações dos trechos superiores dos rios Cuiabá, Paraguai e Uruguai e um processo de especiação incipiente. Em conclusão, este estudo reafirma a ocorrência de uma unidade evolutiva divergente para *A. affinis* do Alto Rio Paraná e que a diferenciação genética destas populações de Parodontidae não é acompanhada pela diversificação morfológica.

Palavras chave: especiação; evolução cariotípica; fluxo gênico; sistemática.

INTRODUÇÃO

A bacia hidrográfica do rio Paraná é a segunda maior da América do Sul, ocupa uma área de 4,3 milhões de km² em regiões territoriais argentinas, bolivianas, brasileiras, paraguaias e uruguaias (AGOSTINHO; JÚLIO, 1999; LOWE-MCCONNELL, 1999). Com uma extensão de 4.500 quilômetros, o Paraná é o rio mais significativo da bacia e ao longo do seu curso recebe inúmeras grandes drenagens: Grande, Iguaçu, Paranaíba, Paranapanema, Tietê, Paraguai, Uruguai (Figura 12), entre outros (LUNDBERG, 1998). Devido ao isolamento histórico proporcionado pelos Saltos das Setes Quedas(Guaíra-PR), a bacia se divide em duas grandes províncias ictiofaunísticas denominadas, Alto Rio Paraná e Baixo Rio Paraná(BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988). Com o represamento da hidrelétrica de Itaipu e consequente inundação dos Saltos de Sete Quedas a barreira geográfica ficou deslocada à barragem da usina em Foz do Iguaçu-PR (LOMWE-MCCONNELL, 1999).

A enorme extensão territorial e a drenagem norte-sul abrigam uma grande diversidade de ambientes na bacia do rio Paraná (HUECK; SEIBERT, 1981). Sua ictiofauna é superior a 300 espécies válidas de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007). Contudo, devido à grande diversidade de ambientes, a descrição de novas espécies é constante (LANGEANI et al., 2007), sendo as ordens Characiformes e Siluriformes as mais abundantes (ROSA; LIMA, 2008). Parodontidae é uma família de Characiformes, conta com três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Saccodon* Kner, 1863; e *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (PAVANELLI; BRITSKI, 2003) e 32 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015). Nesta família, os principais caracteres morfológicos diagnósticos (número de raios nas nadadeiras peitorais, padrão dentário, número de cúspides pré-maxilares e padrão de coloração) apresentam variação contínua, o que têm dificultado a correta diagnose

das espécies e a alocação nos gêneros (PAVANELLI, 1999; PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008).

A espécie *Apareiodon affinis* (Steindachner) é descrita para a região de La Plata, Argentina e ocorre em toda a drenagem do rio Paraná, enquanto *Apareiodon piracicabae*, tem localidade tipo para o rio Piracicaba e ocorre na região do Alto Rio Paraná e bacia do rio São Francisco (PAVANELLI, 1999). Estas espécies são muito similares morfológicamente e a diagnose morfológica só é possível através da contagem de escamas pré-ânus, coloração corpórea e forma dos dentes (PAVANELLI, 1999). No entanto, os estudos citogenéticos comparativos nestas espécies mostram estruturas cariotípicas divergentes, consistentes com isolamento reprodutivo (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTIJUNIOR, 1980, 1984, 1985; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000; SCHEMBERGER et al., 2011).

Apareiodon affinis do Alto Rio Paraná apresenta $2n = 54$ cromossomos em machos e $2n = 55$ cromossomos para as fêmeas e sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo ZZ/ZW₁W₂, enquanto *A. piracicabae* tem $2n = 54$ cromossomos para machos e fêmeas e não apresenta heteromorfismo de cromossomos sexuais (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTIJUNIOR, 1980, 1984, 1985; LEITE; OLIVEIRA; MAISTRO, 2000), além de outras diferenças de marcadores cromossômicos (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). Ainda, a análise citogenética entre representantes de *A. affinis* do Baixo Rio Paraná mostrou que estes não apresentam sistemas de cromossomos sexuais e são caracterizados por apresentar variação do número de cromossomos acrocêntricos (JESUS; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1999; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000, 2004; CALGARO et al., 2004; COELHO, 2014). Coelho (2014) estabeleceu quatro formas cariotípicas diferentes para *A. affinis* (Alto Paraná; Alto Cuiabá; Alto Paraguai e; Alto

Uruguai) e baseado nestes achados propôs a ocorrência do complexo de espécies “*A. affinis*”.

Diante destes dados, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise integrada de contagem de número de cúspides nos dentes sinfiseanos, avaliação dos marcadores cromossômicos e obtenção, sequenciamento e análise do gene citocromo c oxidase I (COI) de seis diferentes populações diagnosticadas morfologicamente como *A. affinis* e uma população de *A. piracicabae*, comparando estes dados morfológicos, citogenéticos e de DNA *barcode* para a avaliação da divergência evolutiva destas populações do complexo de espécies *A. affinis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram avaliados espécimes adultos de duas espécies e sete populações (Figura 12) diferentes de Parodontidae. *Apareiodon piracicabae*, a qual também é morfologicamente semelhante à *A. affinis* e foi utilizada como *in group* na análise de divergência nucleotídica (Tabela 4).

Tabela 4: Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas. *Utilizado como *in group* na análise de divergência nucleotídica.

Espécies	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Nº de ♂	Nº de ♀	Total
<i>A. affinis</i>	Rio Passa Cinco	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	16	15	31
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	12	8	20
<i>A. affinis</i>	Rio Paraná	Represa barragem de Itaipú /Paraná /Alto Paraná	13	14	27
<i>A. affinis</i>	Rio Uruguai	Alto Uruguai / Uruguai / Baixo Paraná	9	8	17
<i>A. affinis</i>	Rio Cuiabá	Alto Cuiabá / Alto Paraguai / Baixo Paraná	6	5	11
<i>A. affinis</i>	Rio Paraguai	Alto Paraguai (Paraguai)	9	7	16
<i>A. piracicabae</i> *	Rio Passa Cinco	Tietê (Alto Paraná)	4	2	6

Extração dos dentes sinfiseanos e organização dos idiogramas

A extração dos dentes sinfiseanos e contagem do número de cúspides dos exemplares de Parodontidae foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Os dados citogenéticos das seis populações de *A. affinis* avaliadas neste estudo foram compilados do estudo de Coelho (2014), enquanto que *A. piracicabae* seguiu o descrito por Bellafronte et al. (2011) e, posteriormente, utilizados para a construção de ideogramas representativos dos cariótipos das espécies e da localização dos sítios rDNA 5s, rDNA 18S, DNA satélite pPh2004 e bandeamento C.

Obtenção das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI)

A reação de amplificação da sequência do gene citocromo c oxidase I (COI) foi realizada com a utilização dos *primers* denominados de Fish F1 e Fish R1 (WARD et al., 2005). A reação foi composta por 1x *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM primers e 50 ng/mL de DNA molde. O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 55,4 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 s e, extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados pelo Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento de DNA.

Sequenciamento e análise das sequências COI

As sequências de DNA COI foram obtidas utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM *Genetic Analyzer*. Sequências COI individuais de 5 indivíduos de cada espécie foram inicialmente analisadas utilizando o programa Bioedit 5.0.9 (HALL, 1999) e uma sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA em cada

espécime. Todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW integrado ao programa Bioedit 5.0.9 (HALL, 1999). A distância genética foi calculada utilizando o modelo Kimura-2-parameter (K2P) (KIMURA, 1980). As análises da distância genética e construção do dendograma utilizaram o programa MEGA 5.01 (TAMURA et al., 2011). Foi elaborado um dendograma Neighbor-joining (NJ) com as distâncias genéticas K2P melhor representar a divergência padrão e separação entre as espécies (SAITOU; NEI, 1987). Para determinar os limites de confiança nas ramificações, os dados foram submetidos ao teste de *bootstrap* (FELSENSTAIN, 1985) para 1000 replicações e os valores estão apresentados em porcentagem próximos aos ramos. As sequências das espécies que foram utilizadas como *outgroup*, *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau*, foram obtidas do *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (RATNASENGHAM; HEBERT, 2007). Todas as sequências obtidas serão depositadas no BOLD por ocasião da publicação do artigo.

RESULTADOS

A contagem de número de cúspides dos dentes sinfiseanos nas seis populações de *A. affinis* evidenciou ampla variação: 11 - 15 cúspides nos espécimes do rio Passa Cinco; 10 – 13 cúspides para o rio Piracicaba; 12 – 13 cúspides para exemplares do rio Paraná, lago da represa de Itaipu, todos do sistema Alto Rio Paraná (Figura 13). Já as populações do sistema Baixo Rio Paraná apresentaram número de cúspides com variação de: 10 – 13 no rio Cuiabá; 11 – 14 no rio Paraguai e; 13 – 17 no rio Uruguai (Figura 14). Por sua vez, *A. piracicabae* apresentou uma variação de 9 – 10 cúspides nos dentes sinfiseanos.

A comparação dos dados citogenéticos da fórmula cariotípica, fórmula cromossômica, sítios de rDNA 5s e 18s e sítios do DNA satélite pPh2004 de

Apareiodon affinis e *Apareiodon piracicabae* das localidades estudadas de estão dispostos na tabela 5 e na figura 15.

Apareiodon affinis do alto rio Paraná tem blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, além de marcações terminais nos braços curto e longo dos cromossomos Z, W₁ e W₂ (Figura 15 d, e, f). Já para os exemplares do rio Cuiabá evidenciaram os blocos heterocromáticos pericentroméricos em todos os cromossomos, em ambas as regiões terminais dos pares cromossômicos 1 e 4, na região terminal do braço longo dos cromossomos 7, 8, 9 e 10 e em região intersticial do cromossomo 26 acrocêntrico (Figura 15 d). Por sua vez, a população do rio Paraguai apresentou bandas pericentroméricas em quase todos os cromossomos do complemento e pequenas bandas intersticiais em alguns pares acrocêntricos (Figura 15 e). Para a população do rio Uruguai os blocos de banda C foram evidentes em região pericentromérica de todos os cromossomos, além de blocos terminais nos pares 1, 4, 12 e 24 e intersticiais nos pares 9 e 26 (Figura 15 f). Por fim, *A. piracicabae* apresentou blocos heterocromáticos pericentroméricos em todos os cromossomos além de blocos terminais de alguns cromossomos (Figura 15 g).

Para cada população/espécie estudada a sequência COI foi obtida de cinco exemplares, as quais apresentaram uma variação entre 659 a 711 pb. As sequências foram de alta qualidade e a sequência consenso de cada grupo não mostrou evidência de inserções, deleções ou códons de parada. A média de divergência genética K2P, dentro das espécies foi de 0,2% e a interespecífica foi de 5,2 %.

A divergência genética K2P apresentada entre as populações avaliadas de *A. affinis* do Alto Rio Paraná (Passa Cinco, Piracicaba e Paraná – represa de Itaipu) foi de 0,28% (Tabela 6). Estas três populações foram sustentadas em um ramo com 100% de valor de *bootstrap* (Figura 16). Ainda, quando analisadas as populações de

A.affinis do Baixo Rio Paraná (rios Cuiabá, Paraguai e Uruguai) a divergência nucleotídica foi de 0,33% (Tabela 6).

Contudo, quando comparadas as populações do Alto Rio Paraná (Passa Cinco, Piracicaba e Paraná – represa de Itaipu), com as do Baixo Rio Paraná (rios Cuiabá, Paraguai e Uruguai) foi obtida divergência nucleotídica média de 6,34%. Ainda, comparando todas as populações de *A.affinis* com o *ingroup* *A. piracicabae*, a divergência média foi de 9,32% (Tabela 6). O dendograma evidenciou ainda que *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* estão situados fora do grupo de *Apareiodon* (Figura 16) e desta forma, formando bons grupos externos.

DISCUSSÃO

A espécie *A. affinis* é encontrada em toda a bacia do rio Paraná enquanto *A. piracicabae* tem distribuição no Alto Rio Paraná (PAVANELLI, 1999). Os caracteres morfológicos diagnósticos são eficientes na separação das duas espécies quando comparadas populações do Alto Rio Paraná, onde ocorrem em sintopia. Nesta região, a forma e o número de cúspides dos dentes sinfiseanos, o número de escamas pré-ânus e o número de faixas acima da faixa longitudinal principal são capazes de discriminar as duas espécies (PAVANELLI, 1999). Entretanto, quando analisadas todas as populações (incluindo *A. affinis* do Baixo Rio Paraná) os caracteres morfológicos se sobrepõem, dificultando sobremaneira a identificação (PAVANELLI, 1999). Da mesma forma, Pavanelli (1999) realizou uma análise das populações de *A. affinis* do Alto e Baixo Rio Paraná e evidenciou sobreposição dos caracteres morfológicos, sugerindo a manutenção de um único táxon (PAVANELLI, 1999).

No presente estudo foi avaliada comparativamente a forma e o número de cúspides entre as seis populações de *A. affinis*, além de uma população de *A.*

piracicabae. Entre as populações de *A. affinis*, os dentes pré-maxilares possuem bordos retos e há sobreposição do número de cúspides, o que torna este caracter ineficaz para a diferenciação populacional. Contudo, o número de cúspides nos dentes sinfiseanos além do formato dos dentes com bordos arredondados auxiliam na discriminação de *A. piracicabae* quando comparado às populações de *A. affinis*. Por outro lado, a utilização do número de cúspides dos dentes sinfiseanos já havia sido proposto ineficaz para separação de populações de *A. affinis* (MOREIRA-FILHO; GARAVELLO, 1994; PAVANELLI, 1999).

Em Parodontidae os caracteres morfológicos diagnósticos são propostos a ser de herança quantitativa (Capítulo I). Desta forma, apresentam distribuição contínua de fenótipos, onde entre os dois extremos há inúmeros fenótipos de difícil separação em classes distintas e ainda, são influenciados pela variação ambiental (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2015). Além disto, estas características estão sobre a influência do controle de genes do desenvolvimento embrionário, os quais dependendo do nível de expressão resultam em variação morfológica, promovendo a sobreposição de caracteres entre pares de espécies (FREEMAN; HERRON, 2009; Capítulo I). Desta forma, embora ocorram evidências citogenéticas e moleculares para a ocorrência de diversificação em *A. affinis* (presente estudo), não há uma diagnose morfológica consistente devido a sobreposição de caracteres (PAVANELLI, 1999).

A diversificação genética em *A. affinis* é evidente. Um estudo citogenético comparativo utilizando seis populações de *A. affinis*: sendo três do Alto Rio Paraná (rio Passa Cinco, rio Piracicaba e rio Paraná, lago da represa de Itaipu) e três populações do Baixo Rio Paraná (Alto Rio Cuiabá; Alto Rio Paraguai e Alto Rio Uruguai) evidenciou organizações cariotípicas divergentes e um provável complexo de espécies “*A. affinis*” (COELHO, 2014).

As populações localizadas na região do Alto Rio Paraná podem ser diferenciadas daquelas do Baixo Rio Paraná pela presença do sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW₁W₂, além de outros marcadores cromossômicos (Figura 15). Quando comparadas as populações do Alto Rio Paraná às do Baixo Rio Paraná quanto ao DNA *barcode* foi obtida divergência nucleotídica média de 6,34% e dois clados independentes na análise de agrupamento. Índices de divergência genética K2P superiores a 2% e *DNA barcode gaps* superior a 10 vezes, são valores considerados válidos para separação de espécies de peixes (WARD et al., 2005; HUBERT et al., 2008; VALDEZ-MORENO et al., 2009). Ainda, a ausência de fluxo gênico entre *A. affinis* do Alto e Baixo Rio Paraná é corroborada neste estudo com ausência de formas cariotípicas ou haplótipos das populações do Baixo Paraná na população da represa de Itaipu.

Bellafronte et al. (2013) também encontrou alta divergência nucleotídica ao comparar uma população de *A. affinis* do Alto Rio Paraná aduas populações do Baixo Rio Paraná. Assim, independente da sobreposição dos caracteres morfológicos, a alta divergência nucleotídica K2P entre as populações confirma os resultados citogenéticos de Coelho (2014) para a separação em espécies distintas, provavelmente resultado do isolamento geográfico histórico das Sete Quedas. Por outro lado, a baixa divergência nucleotídica K2P apresentada entre as populações de *A. affinis* dos rios Passa Cinco, Piracicaba e Paraná – represa de Itaipu sugere a ocorrência do fluxo gênico e a manutenção de uma unidade evolutiva para o Alto Rio Paraná, também corroborado pela mistura de haplótipos observada na análise do dendograma (Figura 16).

Já as populações do Baixo Rio Paraná avaliadas, não apresentam sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, no entanto, evidenciaram estruturas de fórmula

cromossômica e marcadores de DNA satélite diferentes (Figura 15), sugerindo uma provável ausência de fluxo gênico entre as populações (COELHO, 2014). Contudo, para estas populações os baixos valores da análise da divergência nucleotídica K2P (média = 0,33%) são contraditórios aos resultados citogenéticos. Ainda, independente da baixa divergência nucleotídica, a análise de agrupamento evidenciou três ramos, porém com baixos valores de *bootstrap* (Figura 16). Vale salientar que as populações do Baixo Rio Paraná podem dispersar por meio da rota do Baixo Paraná – Rio da Prata – Uruguai - Paraguai, a qual permanece inalterada no últimos 10 milhões de anos (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001). Desta forma, é provável que a diferenciação cariotípica observada nos trechos superiores dos rios avaliados possam apresentar fluxo gênico e polimorfismo cromossômico em trechos médios dos rios, como observado em regiões de confluência dos rios Paraná – Paraguai (CALGARO et al., 2004; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2004).

A alta diferenciação cariotípica para *A. affinis* do Alto Rio Cuiabá, Alto Rio Paraguai e Alto Rio Uruguai, aliada aos baixos valores de divergência nucleotídica para o marcador COI pode indicar um processo de especiação incipiente, como já observado em *Astyanax* (CASTRO et al., 2014). Bellafronte et al. (2013) encontraram baixos valores de divergência nucleotídica para o COI em dois pares de espécies em Parodontidae e mantiveram o status de espécies baseados na descrição morfológica e citogenética.

Em conclusão, este estudo evidencia com a integração de marcadores morfológicos, citogenéticos e de DNA barcode que *A. piracicabae* é um táxon válido. *Apareiodon affinis* do Alto Rio Paraná apresenta organização cariotípica diversificada e alta divergência nucleotídica para o marcador COI quando comparado às populações do Baixo Paraná e, desta forma, deveria ter sua condição taxonômica

revista. Ainda, os resultados para *A. affinis* do Alto Rio Cuiabá, Alto Rio Paraguai e Alto Rio Uruguai indicam que nos trechos superiores destes rios as organizações cariotípicas são estáveis, corroborando com a estruturação populacional e especiação incipiente.

Tabela 5. Fórmula cariotípica, fórmula cromossômica, sítios de rDNA 5s e 18s e sítios do DNA satélite pPh2004 de *Apareiodon affinis* e *Apareiodon piracicabae* das localidades estudadas.

	Localidade	Fórmula cariotípica	Fórmula cromossômica	Sítios rDNA 5S	Sítios rDNA 18s	Sítios pPh2004
<i>A. affinis</i>	Rio Passa Cinco	ZZ/ZW ₁ W ₂	50m/sm+4st [♂] e 49m/sm+6st [♀]	8m	26st	2m, 5sm, 23sm
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba	ZZ/ZW ₁ W ₂	50m/sm+4st [♂] e 49m/sm+6st [♀]	8m	26st	2m, 5sm, 23sm
<i>A. affinis</i>	Rio Paraná	ZZ/ZW ₁ W ₂	50m/sm+4st [♂] e 49m/sm+6st [♀]	8m	26st	2m, 5sm, 14sm, 23sm
<i>A. affinis</i>	Rio Cuiabá	Sem heteromorfismo	42m/sm+2st+10a e 43m/sm+2st+9a	26a / 26m	22st	22st, 23a, 24a, 25a, 26a, 27a
<i>A. affinis</i>	Rio Paraguai	Sem heteromorfismo	36m/sm+2st+16a	22a	19st	20a, 21a, 22a, 23a, 24a, 25a, 26a, 27a
<i>A. affinis</i>	Rio Uruguai	Sem heteromorfismo	46m/sm+4st+4a e 47m/sm+4st+3a	8m	24a, 26a	-
<i>A. piracicabae</i>	Rio Passa Cinco	Sem heteromorfismo	52m/sm+2st	9m	27sm	-

Fonte: COELHO, 2014; BELLAFRONTE, 2011.

Tabela 6. Divergência nucleotídica Kimura-2 parameter entre as populações de *A. affinis*.

	<i>A. affinis</i> Rio Passa Cinco	<i>A. affinis</i> Rio Piracicaba	<i>A. affinis</i> Rio Paraná	<i>A. affinis</i> Rio Cuiabá	<i>A. affinis</i> Rio Paraguai	<i>A. affinis</i> Rio Uruguai	<i>A. piracicabae</i> Passa cinco
<i>A. affinis</i> Rio Passa Cinco	0,06%						
<i>A. affinis</i> Rio Piracicaba	0,12%	0,19%					
<i>A. affinis</i> Rio Paraná	0,34%	0,40%	0,62%				
<i>A. affinis</i> Rio Cuiabá	6,22%	6,28%	6,52%	0,00%			
<i>A. affinis</i> Rio Paraguai	6,35%	6,41%	6,65%	0,43%	0,25%		
<i>A. affinis</i> Rio Uruguai	6,11%	6,18%	6,42%	0,28%	0,28%	0,22%	
<i>A. piracicabae</i> Passa Cinco	8,64%	8,71%	8,92%	9,90%	10,04%	9,72%	0,06%

Nota: Para calcular a média de divergência nucleotídica utilizou-se os valores destacados na tabela. Para comparar *Apareiodon affinis* do alto Paraná (rios Passa Cinco, Piracicaba e Paraná) com os do baixo Paraná (rios Cuiabá, Paraguai e Uruguai) utilizou-se os valores em amarelo, verde e pink. Para a média entre *Apareiodon piracicabae* e *Apareiodon affinis* do alto e baixo Paraná utilizou-se os valores destacados em azul.



Figura 12. Mapa parcial da América do Sul evidenciando o sistema hidrográfico do rio Paraná. Em (A) é apresentado o local das antigas Sete Quedas, inundadas pela represa de Itaipu (B). Este ponto separa o denominado Alto Rio Paraná do Baixo Rio Paraná. Os locais de amostragens de *A. affinis* estão representados por círculos pretos: (1) rio Passa Cinco, (2) rio Piracicaba, (3) rio Paraná – lago da represa de Itaipu, (4) Alto Rio Cuiabá, (5) Alto Rio Paraguai e, (6) Alto Rio Uruguai. O triângulo representa o ponto de amostragem de *Apareiodon piracicabae* (7).

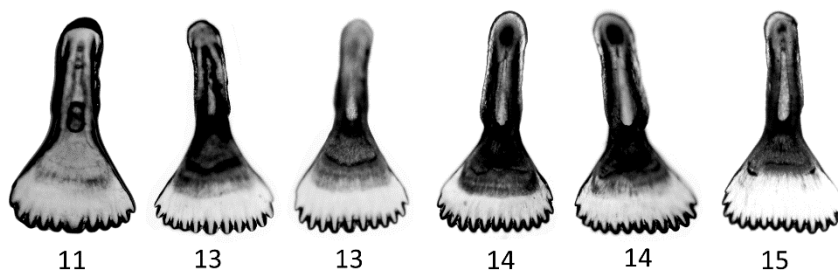
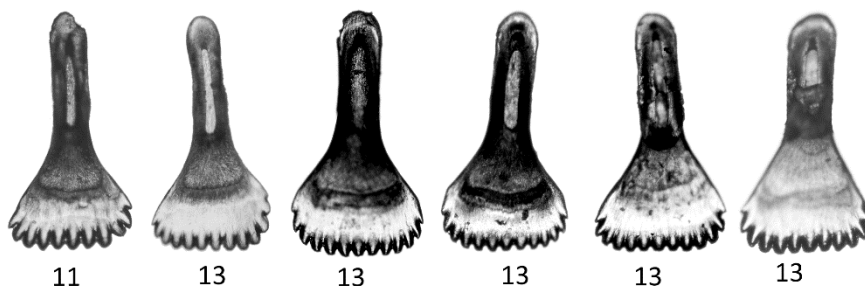
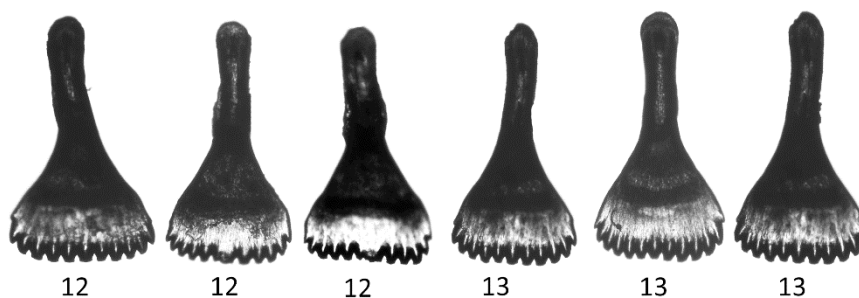
Apareiodon affinis - Rio Passa Cinco*Apareiodon affinis* - Rio Piracicaba*Apareiodon affinis* - Rio Paraná**500 μ m**

Figura 13. Fotos dos dentes sinfiseanos, evidenciando o número de cúspides dos exemplares de *Apareiodon affinis* das populações do Alto Rio Paraná. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.

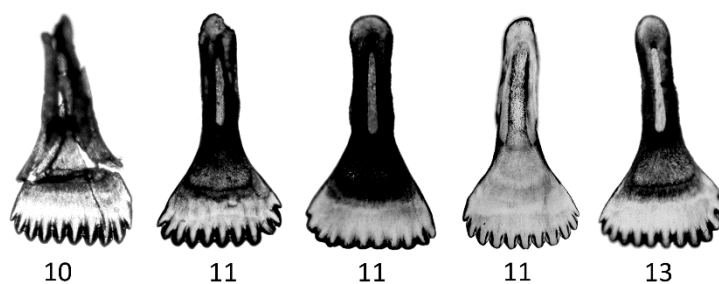
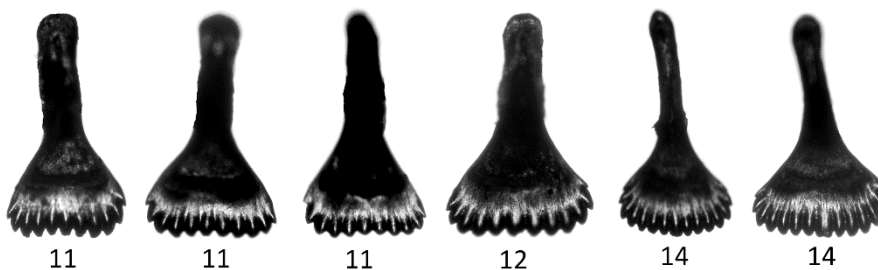
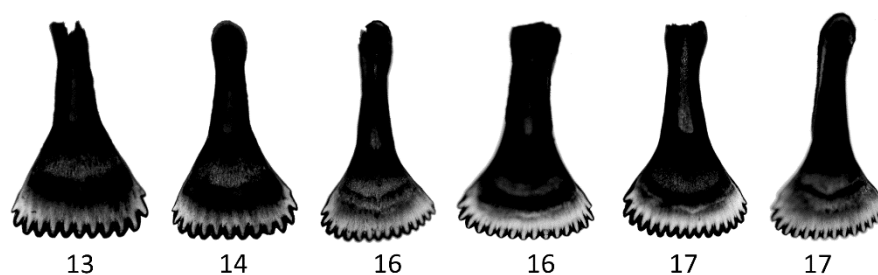
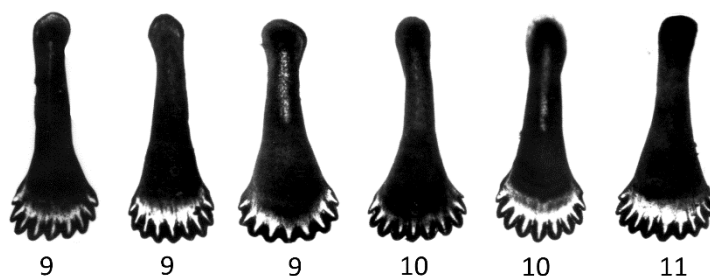
Apareiodon affinis - Rio Cuiabá*Apareiodon affinis* - Rio Paraguai*Apareiodon affinis* - Rio Uruguai*Apareiodon piracicabae* - Rio Passa Cinco500 μ m

Figura 14. Fotos dos dentes sinfiseanos, evidenciando o número de cúspides dos exemplares de *Apareiodon affinis* das populações do Baixo Rio Paraná. A numeração abaixo de cada dente indica o número de cúspides.

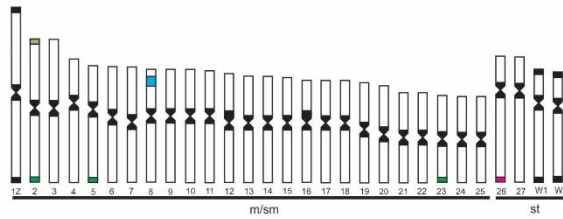
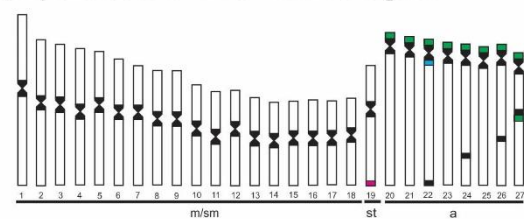
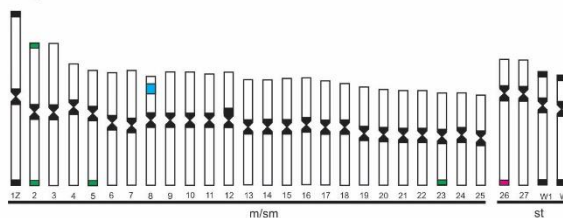
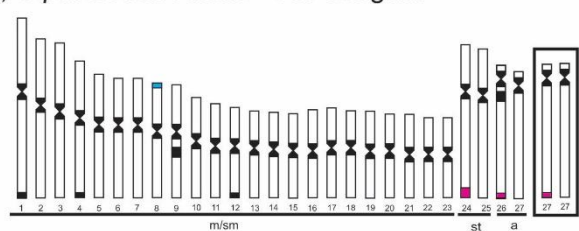
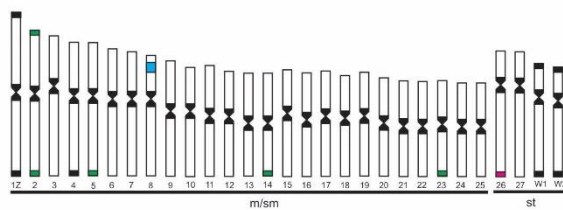
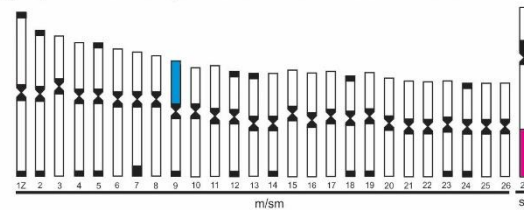
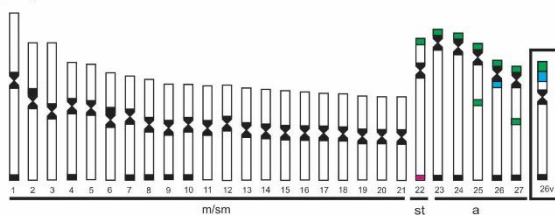
(a) *Apareiodon Affinis* - Rio Passa Cinco(e) *Apareiodon Affinis* - Rio Paraguai(b) *Apareiodon Affinis* - Rio Piracicaba(f) *Apareiodon Affinis* - Rio Uruguai(c) *Apareiodon Affinis* - Rio Paraná(g) *Apareiodon piracicabae* - Rio Passa Cinco(d) *Apareiodon Affinis* - Rio Cuiabá

Figura 15. Ideograma representativo dos cariótipos de diferentes populações de *Apareiodon affinis* e de uma população de *Apareiodon piracicabae*. As cores das regiões marcadas representam os marcadores cromossômicos: heterocromatina constitutiva (preto), localização dos sítios rDNA 5S (azul), localização dos sítios de rDNA 18S (pink), localização dos sítios de DNA satélite pPh2004(verde) (COELHO, 2014; BELLAFRONTE, 2011)

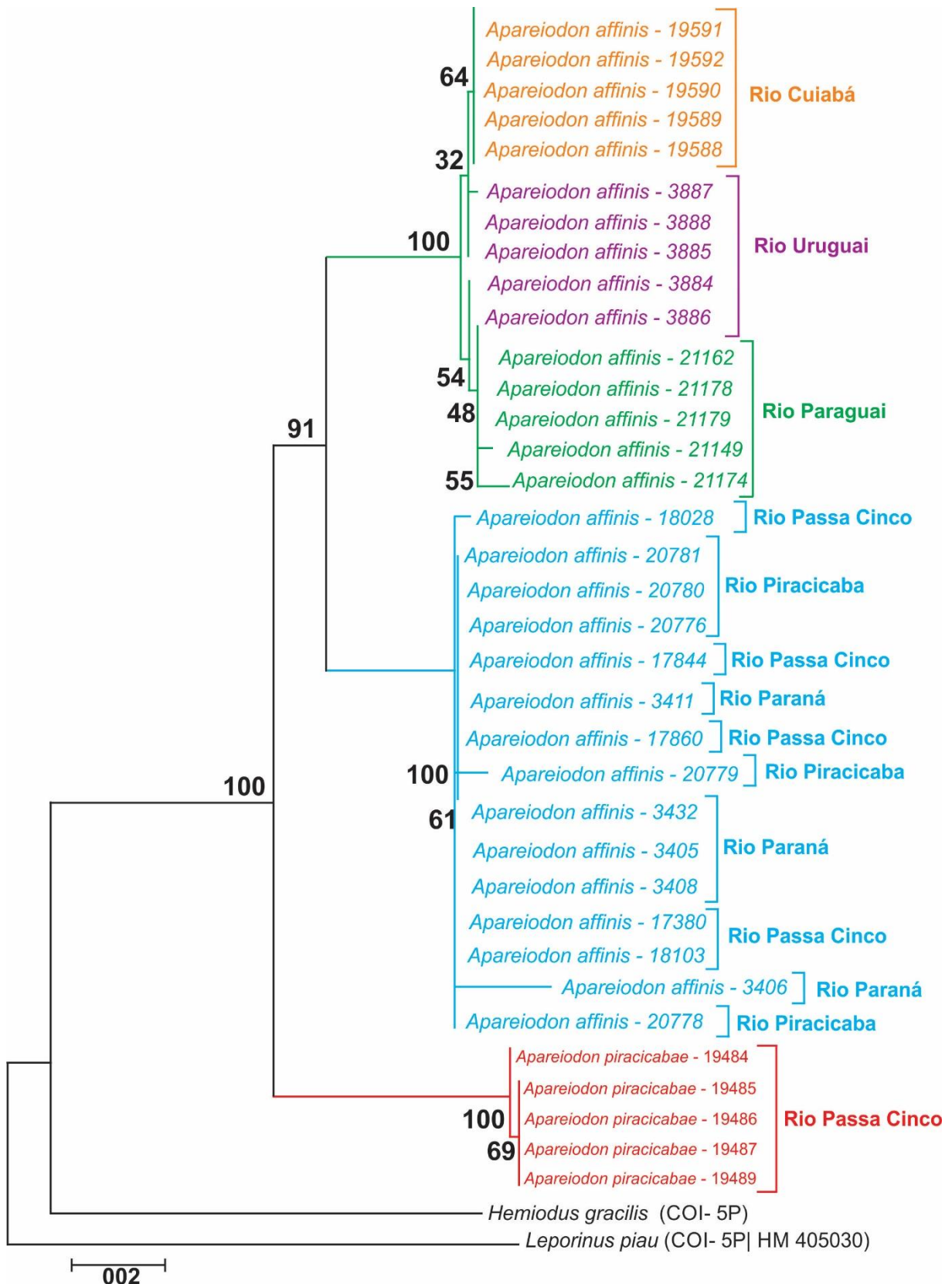


Figura 16. Dendrograma de Neighbor-Joining, mostrando todas as populações de *A. affinis* analisadas juntamente com as espécies *Apareiodon piracicabae*, *Hemiodus gracilis* e *Leporinus piau* as quais que foram utilizadas para enraizamento dos ramos. A escala indica a distância evolutiva inferida pelo número de substituições por bases.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada uma análise integrada de marcadores morfológicos, citogenéticos e de DNA barcode para os pares de espécies *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. (população do rio Verde, bacia do rio Tibagi) e também para seis populações de *Apareiodon affinis* comparada a uma população de *Apareiodon piracicabae*.

Os dados genéticos evidenciam que *Apareiodon* sp. é um táxon válido, com distribuição para a bacia do rio Paranapanema, enquanto *A. ibitiensis* ocorre na bacia do rio Tietê.

A análise da divergência nucleotídica para o gene citocromomo oxidase I (COI) evidenciou que *A. ibitiensis* da bacia do rio São Francisco também é divergente de *A. ibitiensis* do Alto Rio Paraná, embora possuam organizações cariotípicas e morfologia similares.

A diferenciação molecular do cromossomo sexual W em estágios divergentes entre *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp. pode corroborar com a restrição ao fluxo gênico entre as espécies parapatricas.

Apareiodon piracicabae é geneticamente divergente em relação à *A. affinis*, embora possuam morfologia similar, com sobreposição de inúmeros caracteres morfológicos diagnósticos.

A espécie *A. affinis* do sistema do Alto Rio Paraná deveria ter a condição taxonômica revista, uma vez que apresenta organização cariotípica e divergência para o gene COI consistente com ausência de fluxo gênico às populações de *A. affinis* do Baixo Rio Paraná.

No Baixo Rio Paraná, nos trechos superiores dos rios Cuiabá, Paraguai e Uruguai, as populações avaliadas de *A. affinis* são diferenciadas cariotipicamente,

porém com baixo valor de divergência nucleotídica para o gene COI, indicando estruturação populacional e especiação incipiente.

6. REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A; JÚLIO, H. F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In:LOWE-MCCONNELL, R.H.**Estudos ecológicos de comunidade de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 374-400.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p. 70-78, 2005.
- ALMEIDA, F. F. M.; HASUI, Y.; PONÇANO, W. L.; DANTAS, A. S. L.; CARNEIRO, C. D. R.; MELO, M. S.; BISTRICHI, C. A. **Mapa Geológico do Estado de São Paulo**.1981, 126p. Monografia. Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT, São Paulo, 1981.
- AMORIM,N. P. L., GIONGO, P., BELEI, F., SAMPAIO, W. M. S. Inventário da Ictiofauna do rio Santa Catarina, bacia do Rio São Francisco) no município de Vazante, Minas Gerais. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**. Rio Paranaíba, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2013.
- ARON, A.; SOLÉ-CAVA, A. M. Recrutamento, mortalidade e deslocamento na fase adulta da anêmonas-do-mar *Bunodosoma caissarum*(Corrêa, 1964).In: **CONGRESSO NACIONAL DE ZOOLOGIA**, XVIII, 1991, Salvador-BA, **Resumo**. 1991.
- ARTONI, R. F; VICARI, M. R; ALMEIDA, M. A; MOREIRA FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.19, n. 3, p.393-401, 2009.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155–165, 2002.
- BARRELLA, W. **Alterações das comunidades de peixes nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema (SP), devido a poluição e ao represamento**. 1998, 115 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- BARRELLA, W., PETRERE Jr., M., SMITH, W.S., MONTAG, L.F.A. As relações entre as matas ciliares, os rios e os peixes. In:RODRIGUES, R. R; LEITÃO FILHO, H, F. (eds.). **Matas ciliares: Conservação e recuperação**.EDUSP, São Paulo, 2000, p.187-207.

BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 481-49, 2005.

BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 710-716, 2005.

BELLAFRONTE, E.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**, v.75, p. 2313-2325, 2009.

BELLAFRONTE, E.; SCHEMBERGER, M. O., MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; MARGARIDO, V. P.; VICARI, M. R. Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Fish Biology and Fisheries**, v.21, n.3, p.559-570, 2011.

BELLAFRONTE, E.; SCHEMBERGER, M. O.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, M.; VICARI, M. R. Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n.4, p. 770-776, 2012.

BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T. C.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 497-506, 2013.

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

BESPALHOK, F. J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Noções de Genética quantitativa**. p. 11-18. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br> Acesso em 15 jan.2015.

BLANCO D. R.; BERTOLLO L. A. C.; VICARI M. R.; MARGARIDO V. P.; ARTONI R. F.; MOREIRA-FILHO O. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 351-357, 2012.

BLAXTER, M. Counting angels with DNA. **Nature**, v. 421, p. 122-124, 2003.

BONETTO, A.A. The Paraná river system. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. **The Ecology of River Systems**. 1ed. USA: Springer, 1986, p. 541-545.

BONILLA, A.; MACHADO-ALISSON A.; SILVERA, C.; CHERNOFF, B.; LÓPEZ H.; LASSO, C. A. *Apareiodon orinocensis*, una nueva espécie de pez de água Dulce (Pisces: Characiformes: Parodontidae) proveniente de los rios Caura y Orinoco, Venezuela. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 19, p.1-10, 1999.

BRASIL. Agência Nacional das Águas. **A evolução da gestão dos recursos hídricos no Brasil**. Brasília, ANA, 68 p., 2002.

BRASIL. Agência Nacional das Águas. **Região Hidrográfica do São Francisco**. Disponível em:<<http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/SaoFrancisco.aspx>> Acesso em: 18 dez. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL. **Atlas de energia elétrica do Brasil**, 3.ed., 236 p. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Programa zoneamento ecológico-econômico **Caderno da Biodiversidade**. 1. ed. Brasília, 2009.

BRITSKI, H.A; LANGEANI, F. *Pimelodusparanaensis* sp.n, um novo *Pimelodidae* (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.5, n.3, p. 409-417, 1988.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E. VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 603 p., 1998, p.123-144.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A; GHAZZI, M.S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional do Rio de Janeiro, 2007.

BURKE, A. C.; NELSON, C. E.; MORGAN, B. A.; TABIN, C. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. **Development**, v.121, p. 333-346, 1995.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.36, p.135-153, 2005.

CALGARO, M.R; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; RONCATI, H.A. Karyology of *Apareiodon affinis* from Parana River (Argentina): I. Chromosome Polymorphism. **Cytologia**, v.69, p.475-479, 2004.

CASTRO, J. P; MOURA, M. O; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI M. R.; ALMEIDA, M. C. de; ARTONI R. F. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 429-438, 2014.

CASTRO, R. M. C.; CASSATI, L. The fish fauna from a small forest stream of upper Paraná River basin. **Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 337-352, 1997.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic analysis; models and estimation procedures, **Evolution**, v.21, p. 550-570, 1967.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, p. 139-150, 2002.

CHANG, C. H.; ROUGERIE, R.; CHEN, J.H. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. **Pedobiologia**, v.52, n.3, p.171-180, 2009.

COELHO, K. A. **Análise cromossômica comparativa entre populações de *Apareiodon affinis* (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae)**. 2014, 91p. Dissertação (Programa de Pós – Graduação em Biologia Evolutiva -Associação ampla entre UEPG e UNICENTRO), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

COUNCIL, N.R. **Upstream: salmon and society in the pacific Northwest**. Washington, D. C., National academy press, 1996, 472 p.

CUVIER, G.; A. VALENCIENNES. **Histoire naturelle des poissons**. Livre XXII. Paris, Bertrand, 1849, 532 p.

DEBONA, T.; ARSEGO, E.; dos SANTOS, V.V.; DAMASCENO, D.Z.; VIANNA N.C.; BAUMGARTNER, G. Composição ictiofaunística do rio das Cinzas – bacia do rio Parapanema, São Paulo, Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA E XII SEMANA ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE PESCA, Toledo-Paraná, 2010. **Resumo**, Toledo-Paraná, 2010. Disponível em: <http://cac.php.unioeste.br/eventos/engenhariapesca/eventos/II_SINPESCA/Engenharia_de_Pesca/arquivo14.pdf> Acesso em 05/01/2015.

DOBLER, S.; MULLER, K. Resolving phylogeny at the family level by mitochondrial cytochrome oxidase sequence: phylogeny of carrion beetles (Coleoptera, Silphidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 309-402, 2000.

DOYLE J. J., DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1990.

EIGENMANN, C. H. Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate America. In: HATCHER J. B. **Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899**, Zoology, v. 3, n.2, part 4, 1910, p. 375-511.

EIGENMANN, C. H. On *Apareiodon*, a new genus of characid fishes. **Annals Carnegie Museum**, v.10, p. 71-76, 1916.

ERIKSSON, J.; SIEDEL, H.; LUKAS, D.; KAYSER, M.; ERLER, A.; HASHIMOTO, C.; HOHMANN, G.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (*Pan paniscus*). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 4, p. 939-949, 2006.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species of Fishes by family/subfamily**. Dispon. em: <<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

FALCÃO, J. N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An additional chromosome in two fish species. **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, p. 109-118, 1984.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.

FERREIRA-NETTO, A. L. **Relações filogenéticas dos gêneros de Lebiasinidae (Ostariophysi, Characiformes)**. 2006, 375 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro/Museu Nacional, Brasil, 2006.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 5, p. 294-299, 1994.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise Evolutiva**. 4 ed., São Paulo: Artmed, 2009, 831 p.

FRÉZAL, L. E.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

GALETTI JUNIOR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*, v. 44, p. 287–292, 1991.

GARAVELLO, J. C. Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do Rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 37, p. 447-455, 1977.

GARRIGAN, D.; HAMMER M. F. Reconstructing Human Origins in the genomic era. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, p. 669-690, 2006.

GÉRY, J. Contributions a l'étude des poissons Characoides (Ostariophysi) (II.) *Roeboexodon* gen. N. de Guyane, redescription de *R. guyanensis* (Puyo, 1948) et relations probables avec les formes voisines. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, série 2, v. 31, n. 4, p. 345-352, 1959.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. 1. ed., Maringá: **EDUEM**, 2007, 241 p.

GREENWOOD, P. H.; ROSEN, D. E.; WEITZMAN, S. H.; MYERS, G. S. Phyletic studies of Teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 131, p. 339-456, 1966.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI C.; SOLÉ-CAVA A. M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology*, Londres, v. 137, p. 435-446, 2000.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HICKEY, D. A. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome*, v. 49, p. 851-854, 2006.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. G.; CLARE, E. L.; HEBERT, P. D. N. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*, v. 5, p. 1-15, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

HEBERT, P. D. N.; YWINSKA, A; BALL, S. L.; WAARD, J. R. de. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings the Royal Society B**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMILAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **Plos Biology**, v. 2, p.1657-1663, 2004.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, C.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L.; . Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLOS ONE**, v. 3, n.6, p. 2490, 2008.

HUECK, K; SEIBERT, P. **Vegetationskarte von Sudamerika**. 1. ed. German: Stuttgart, 1981, 90 p.

INGENITO, L. F. S.; BUCKUP, P. A. A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia**, p. 765-771, 2005.

INGENITO, L. F. S.; BUCKUP, P. A. The Serra da Mantiqueira, south-eastern Brazil, as a biogeographical barrier for fishes. **Journal of Biogeography**, v.34, p.1173-1182, 2007.

INGENITO, L. F. S. **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes)**, 2008, 146p. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas(Zoologia), Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

JESUS, C. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica**, v. 105, p. 63-67, 1999.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**, v. 65, p. 397-402, 2000a.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). **Ichthyological Exploration Freshwaters**, v. 11, 75-80, 2000b.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**, v. 109, p. 267-273, 2000.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 57, p. 203-207, 2004.

KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R; PERES, W. A. M.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO L. A. C.; MOREIRA-FILHO O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v. 75 p.408–421, 2009.

KEENEY, D. B; HEUPEL, M.R; HUETER, R.E AND HEIST, E.J. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1911–1923, 2005.

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNER, R. Eine uebersicht der ichthyologischen Ausbeute des Herrn Professors Dr. Mor. Wagner in Central-Amerika. Sitzungsber. Koenigl. Bayer. Akad. Wiss. **Muenchen**, v. 2, p.220- 230, 1863.

KUMAR S., GADAGKAR, S. R. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, p. 544-553, 2000.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUBLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v.9, p. 299-306, 2008.

LAIKRE, L; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio**, v. 34, n. 2, p.111-119, 2005.

LANGEANI, F. Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1988, com a descrição de quatro novas espécies do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). **Comunicações do Museu de Ciências**. PUCRS, p. 3-31, 1990.

LANGEANI, F.; SERRA, J.P.; CARVALHO, F.R.; CHAVES, E.F.; FERREIRA, C.P. MARTINS, F.O. Fish, *Hasemanian crenuchoides* Zarske & Géry, 1999 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae): rediscovery and distribution extension in the upper rio Paraná system, Minas Gerais, Brazil. **Check list**, v. 3, n.1, p. 119 -122, 2007.

LEMER, S., AURELLE, D., VIGLIOLA, L, DURAND, J. D, BORSA, P. Cytochrome b barcoding, molecular systematics and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, p.86-94, 2007.

LEITE, M. F.; OLIVEIRA, G. A.; MAISTRO E. L. Determinação da constituição cariotípica básica da espécie *Apareiodon* cf. *affinis* (Pisces, Characiformes, Parodontidae) coletados no rio Sapucaí, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, Águas de Lindóia, 46°, 2000, São Paulo, **Resumo**, São Paulo, 2000, p. 50.

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

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1999, 534 p.

LUNDBERG, J.G. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: MALABARBA, L.R. et al. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p 49-68.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 1981, 442p.

MACAYA-SANZ, D.; SUTER, L.; JOSEPH, J.; BARBARÁ, T.; ALBA, N.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S. C.; WIDMER, A.; LEXER, C. Genetic analysis of post-mating reproductive barriers in hybridizing European *Populus* species. **Heredity**, v.107: 478-486, 2011.

MALDONADO-OCAMPO, J. A.; ORTEGA-LARA, A.; OVIEDO, J. S. U.; VERGARA, G. G.; VILLA-NAVARRO, F. A.; GAMBOA, L. V.; PRADA-PEDREROS, S.; RODRÍGUEZ, C. A. **Peces de los Andes de Colômbia: Guía de campo**. Bogotá, Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. 346p., 2005.

MARCENIUKI, A. P.; HILSDORFI, A. W. S.; LANGEANI, F. A ictiofauna de cabeceiras do rio Tietê, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 217 – 236, 2011.

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

MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001, 202 p.

MENEZES, N. A. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* from Central and South America. In: VAZOLINI, P.E; HEYER, W.R. **Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p295-304.

MENEZES, R. S. Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) Ameaçadas no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13. n. 3, p. 647-667. 1996.

MILACH S. C. K. Principais Tipos de Marcadores e suas Características. In: MILACH, S. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998, p. 17-28.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855-1867, 2003.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Evindences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 33, p. 83-91, 1980.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Struture and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, p. 564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Picies-Cypriniformes) **Caryologia**, v. 38, p. 47-55, 1985.

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

MOREIRA-FILHO O.; GAVARELLO J. C. Estudos de cúspides dentárias de seis espécies de Parodontidae e sua aplicação na sistemática desta família (Pisces, Characiformes). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, XX, 1994, Rio de Janeiro. **Resumo**, Rio de Janeiro, 1994, p. 88.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas da ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. 2007, 468 p. Tese de Doutorado em Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 401-407, 2002.

NANDA I.; SCHORIES S.; TRIPATHI N.; DREYER C.; HAAF T.; SCHMID M.; SCHARTL M. Sex chromosome polymorphism in guppies. **Chromosoma**, v. 123, p. 373–383, 2014.

NAKAJIMA R. T.; CABRAL-DE-MELLO D. C.; VALENTE G. T.; VENERE P. C.; MARTINS C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, p. 198, 2012.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4. ed. John Wiley & Sons, New Jersey: Hoboken, 2006, 624 p.

NOMURA, H. Caracteres Merísticos e dados biológicos sobre o canivete *Parodon tortuosus* Eigenmann & Norris, 1990, do Rio Mogi Guaçu, São Paulo (Osteichthyes, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 39, p. 451-456, 1979.

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

PAIVA, S. R.; ROSA, A. J. M. **Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**, Planatina: Embrapa Cerrados, 2009, 35p.

PAVANELLI, C. S. **Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. 1999, 332 p. Tese de Doutorado em Zoologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

PAVANELLI, C. S. Family Parodontidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003, p 46-50.

PAVANELLI, C. S.; BRITSKI, H. A. *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with Description of three New species. **Copeia**, v. 2, p. 337-348, 2003.

PAVANELLI, C. S. New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Copeia**, p. 89-95, 2006.

PAVANELLI, C. S. Família Parodontidae In: Buckup A B, MENEZES N. A.; GHAZZI M. S. (Eds) **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, 2007.

PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G., HANNER, R., FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul river Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 21, p. 1-9, 2010.

PERSIS, M.; REDDY, A. C. S.; RAO, L. M.; KHEDKAR. G. D.; RAVINDER, K.; NASRUDDIN. K. COI (cytochrome oxidase-I) sequence based studies of Carangid fishes from Kakinada coast, India. **Molecular Biology Report**, v. 36, p.1733-1740, 2009.

PINESE, J. P. P. Síntese geológica da bacia do rio Tibagi. In: (Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A; eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E. Medri, 2002, p. 21-38.

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

PONÇANO, W.L.; CARNEIRO, C.D.R.; BISTRICHI, C.A.; DE ALMEIDA, F.F.M.; PRANDINI, F.L. **Mapa Geomorfológico do Estado de São Paulo**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo, Publicação n. 1183, 1981, 94p.

POOK, C. E.; MCEWING, R. Mitochondrial DNA sequences from dried snake venom: a DNA barcoding approach to the identification of venom samples. **Toxicon**, v. 46, p. 711-715, 2005.

PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E.; FALCÃO, J. N.; NAKAYAMA, C. M. Cytogenetics studies in *Hemiodidae* (Ostariophysi, Characiformes) fishes from central amazon. **Cytologia**, v. 58, p. 397-402. 1993.

PUCCI, M. B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; PENSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, p. 541-553, 2014.

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

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.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life System. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355-364, 2007.

REIS, R.E.; KULLANDER S.O.; FERRARIS, C. **Check List of freshwater Fishies of South and Central América**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, 742 p.

REMIGIO, E. A.; HEBERT, P. D. N. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 641–647, 2003.

ROBERTS, T. R. Dental polymorphism and systematics in *Saccodon*, a neotropical genus of freshwater fishes (Parodontidae, Characoidei). **Journal of Zoology**, v. 173, p. 303-321, 1974a.

ROBERTS, T. R. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v.146, p. 411-472, 1974b.

ROSA, R.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**, v. 128, p. 159–166, 2006.

ROSA, S.R.; LIMA, F.C. **Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção**, 2008, 278 p. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/porta1/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumell/Peixes.pdf>> Acesso em: 16 ago. 2014.

RUBINOFF, D. DNA barcoding evolves into the familiar. **Conservation Biology**, v.20, n. 5, p. 1548–1549, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, p. 406-425, 1987.

SAMPAIO, T.M. **Parâmetros morfométricos para melhoria da acurácia do mapeamento da rede de drenagem – uma proposta baseada na análise da Bacia Hidrográfica do Rio Benevente – ES**. 2008, 145 p. Tese de Doutorado em Geografia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SANTOS, D.B.; VIDOTTO, M.L.; BERTINATTO, R.; MARCON, G.R.S.M.; FRIGO, E.P. Caracterização morfométrica da bacia hidrográfica do rio São José, Cascavel, PR. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 7-18, 2012.

SAZIMA, I. Behavior of two Brazilian species of parodontid fishes, *Apareiodon piracicabae* and *A. ibitiensis*. **Copeia**, v.1, p. 166-169, 1980.

SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; SCHUHLLI, S. G.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v.139, p.1499–1508, 2011.

SCHEMBERGER, M.O.; OLIVEIRA, J. I. N.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, v. 11, p. 518-527, 2014.

SCHINDEL D. E.; MILLER S. E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. **Nature**, v. 435, p. 17, 2005.

SCHULTZ, L. P.; MILES, C. Descriptions of a new genus and a new species of Parodontinae, characinid fishes from South America. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 33, p. 251-255, 1943.

SHAFFER, H. B., THOMSON, R. C. Delimiting species in recent radiations. **Systematic Biology**, v. 56, p. 896-906, 2007.

SHIBATTA, O.A., ORSI, M.L., BENNEMANN, S.T., SILVA-SOUZA, A.T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E., BIANCHINI, E.,

SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. (eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, 2002, 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**, v. 7, p. 125-134, 2007.

SILVA, M. da; MATOSO, D. A.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MAGARIDO, V. P.; ARTONI, R. F. Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 303-307, 2011.

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction “primers”. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407-417, 2001.

SLAMOVITS C. H.; COOK J.A.; LESSA E. P.; ROSSI M. S. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tucos-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, p. 1708–1719, 2001.

STARNES, W. C.; SCHINDLER, I. Comments on the genus *Apareiodon* Eigenmann (Characiformes: Parodontidae) with the description of a new species from the Gran Sabana region of Eastern Venezuela. **Copeia**, p. 754-762, 1993.

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

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003, 287 p.

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, Z.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; RÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 42, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, v. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, n. 2, p. 70-74, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**., v. 22, p. 4673- 4680, 1994.

THUESEN, P. A; PUSEY, B. J; PECK, D. R; PEARSON, R.; CONGDON, B. C. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p.1174-1187, 2008.

TRAVASSOS, H. Ictiofana de Pirassununga. I- Subfamília Parodontidae Eigenmann, 1916 (Actinopterygii-Cypriniformes). **Boletim do museu nacional** (N. Sér. Zool.), Rio de Janeiro, v. 129, p. 1-31, 1955.

VALENTE, R, de O, A. **Análise da estrutura da paisagem na bacia do rio Corumbataí, SP**. 2001, 161 p. Dissertação. Mestrado em Recursos Florestais. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 2001.

VALDEZ-MORENO, M.; IVANOVA, N.V.; ELÍAS –GUTIEREZ, M. Contreras-Balderas S and Hebert PDN. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 377-402, 2009.

VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p. 163-168, 2006.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v.122, p. 67–72, 2008.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite

DNA and chromosomes in neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p.1094–1116, 2010.

VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, p. 365-369, 2001.

VICENTE, V. E.; BERTOLLO, L. A. C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**, v. 119, p. 115-120, 2003.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p.329-356, 2009.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **Bio Essays**, v. 29, p. 188-197, 2007.

WEITZMAN, S.H.; VARI, R.P. Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 2. p. 444-465, 1988.

WICHMAN H. A.; PAYNE C. T.; RYDER O. A.; HAMILTON M. J.; MALTBIE M.; BAKER R. J. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**, v. 82, p. 369–377, 1991.

WILSON, E. O. The encyclopedia of life. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 77-80, 2003.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: _____. **Aquicultura – Experiências Brasileiras**. 1. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003, p. 337-369.

ZIEMNICZAK, K., TRALDI, J. B., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO, O., VICARI, M. R., In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes) **Cytogenetic and Genome Research**, 2015. doi:10.1159/000370297

ZIESLER, R.; ARDIZZONE, G.D. **The inland waters of Latin America**. Copescal Technical Paper, n. 1. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Roma, 1979, 171p.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO



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	colecção

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

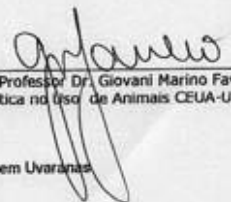
CARTA DE APROVAÇÃO

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 Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 3 - Obtenção de cromossomos mitóticos

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada seguindo a técnica de preparações diretas (BERTOLLO et al., 1978). Na região intra-abdominal no animal injetou-se uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100 g de peso. Os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 50-60 minutos, posteriormente foram anestesiados com benzocaína diluída a 0,01%, e sacrificados. Retirou-se a porção do rim anterior e dissociada com uma seringa desprovida de agulha em cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M). O tecido dissociado foi incubado em estufa a 37°C durante 25-30 minutos, depois re-suspendido com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para tubo de centrifuga. Adicionou-se neste tubo 1ml de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), o material foi novamente re-suspendido várias vezes, centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm e depois descartado o sobrenadante. Após a centrifugação adicionou-se 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspendido e centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm, este passo foi repetido 2 vezes. Descartou-se o sobrenadante e adicionou uma quantidade de fixador para que se obtivesse uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml), re-suspendido e armazenado em freezer para posterior utilização.

Para confecção de lâminas foi pingado de 150 microlitros da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. A lâmina estava limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorresse e permitisse que o material ficasse aderido sobre a lâmina. O material foi então deixado secar ao ar e corado com solução de Giemsa a 5 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

Anexo 4 - Obtenção de cromossomos mitóticos via cultura de campo (Blanco et al., 2012).

Este método consiste em iniciar a preparação cromossômica logo após a captura dos animais no campo. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal e manter o espécime vivo por 45 – 50 min. 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 6 ml da solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociar as células com uma seringa desprovida de agulha, homogeneizar e incubar em temperatura ambiente durante 30 minutos. Após, acrescentar 2 ml de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes. Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, com os tubos mantidos em refrigeração até o acesso ao laboratório (até 168h). No laboratório, homogeneizar e centrifugar durante 10 minutos, a 1000 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 1000 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 5 - Detecção da heterocromatina constitutiva: bandas-BSG (SUMENER, 1972, com algumas adaptações)

As lâminas contendo o material celular foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Incubadas a 28°C em solução de bário (Ba (OH)_2) durante 1 a 2 minutos. Depois as lâminas foram submergidas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavadas com água destilada. O material foi imerso em solução salina 2x SSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavado em água destilada e secado ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo 6 - Reação de mini preparação plasmidial (kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare))

Transferir a cultura para tubo de 1,5 mL e centrifugar 16.000 g por 30 s. Descartar o sobrenadante e re-centrifugar toda a cultura restante. Adicionar 175 uL do Lysis Buffer type 7 e vortexar para desmanchar o precipitado. Adicionar 175 uL do Lysis Buffer type 8 e inverter vagarosamente o tubo 5 vezes. Adicionar 350 uL do Lysis Buffer type 9 e inverter vagarosamente até o precipitado se tornar claro. Centrifugar 16.000 g por 4 min. Colocar um ilustra plasmid mini column em um tubo coletor e adicionar o sobrenadante à coluna. Centrifugar 16.000 g por 30 s e descartar o que passou no tubo coletor. Adicionar 400 uL de wash buffer type 1 à coluna e centrifugar 16.000g por 1 min. Descartar o tubo coletor e o seu conteúdo. Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 100 uL do elution buffer type 4, deixar 30 s a temperatura ambiente e centrifugar 16.000 g por 30 s.

Anexo 7- Marcação de sondas por nick translation, kit biotin-nick translation mix (Roche Applied Science)

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

Anexo 8 - Marcação de sondas por nick translation, kit dig-nick translation mix (Roche Applied Science)

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

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

O procedimento geral da FISH seguiu o descrito por Pinkel et al. (1986). Os produtos das reações de marcação de sonda, por “nick translation”, foram precipitados com acetato de potássio e mantido em etanol por 16 horas (*overnight*) a -20°C. Posteriormente, as sondas foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm, sendo descartado o sobrenadante, na continuidade o DNA marcado foi seco em estufa a 37°C.

A. Preparação da solução de hibridação

Em todas as FISH, a mistura de hibridação consistiu de: 200 µl formamida (50% de formamida); 80 µl sulfato de sextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µl de 20x *saline salt citrate* - SSC (concentração final 2x SSC); 80 µl de H₂O qsp, perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 1 µg da sonda 1 (DNA marcado com biotina) + 1 µg da sonda 2 (DNA marcado com digoxigenina 11dUTP), (Double FISH). A estringência destas misturas de hibridação foi de 77 %. Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

B. Preparação das lâminas (lavagens pré-hibridação)

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em tampão fosfato (*phosphate buffer saline*-PBS), por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em

cada incubação. 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, 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 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada incubação. As lâminas foram então tratadas com formamida 70 % dissolvida em 2x SSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol gelado a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada banho.

C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2x SSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de 2x SSC pH 7,0 por 20 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão *non fat dry milk* (NFDM) a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas uma mistura de 100 µl de tampão NFDM contendo 1:1000 de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/ml e 5:1000 de anti digoxigenina rodamina a 1 µg/ml; permanecendo por 1 h a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - 0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

D. Análises dos resultados

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels(Carl Zeiss®).As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

Anexo 10 - Extração dos dentes

A extração dos dentes foi realizada seguindo a metodologia de Moreira-Filho e Garavello (1994). Com auxílio de estereomicroscópio e uma agulha hipodérmica foram retirados os dentes sinfiseanos dos exemplares de Parodontidae em análise. Cada dente foi colocado em lâmina escavada contendo hipoclorito de sódio 2,5%. Logo a seguir foi transferido para outra cavidade da lâmina contendo peróxido de hidrogênio em solução 10%, permanecendo por 3 minutos. Posteriormente, os dentes foram armazenados em álcool 70 v/v por 10 dias. Os dentes foram então fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) em aumento 40x.

Anexo 11 - Extração de DNA

Extração de DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990), retirou um pequeno pedaço 15mm³ do fígado ou músculo do animal e foi colocado em um microtubo; adicionou 360µl de tampão (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M) sem CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio); acrescentou 13 µl de proteinase K (10mg/mL), 5 µl de β-mercaptoetanol e 240 µl de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 5% cristalizado, posteriormente incubou em banho-maria a 55°C, overnight ou até digerir totalmente o tecido. Após este período adicionou-se 600 µl de clorofórmio e agito-se por 5 minutos em *vortex* suave, em seguida centrifugou a 8000 rpm por 5 minutos e retirou o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo; adicionou-se 600 µl de etanol absoluto e armazenar a – 20 °C por 2 horas ou overnight. Posteriormente centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos e descartou o sobrenadante. Deixou somente o *pellet*. Em seguida lavou o *pellet* com 500 µl de etanol a 70 v/v, sem agitar. Centrifugou por 2 minutos a 14.000 rpm e retirou o sobrenadante. Armazenou em estufa a 37 °C. Posteriormente, adicionou 5µl de RNase e colocou 1 hora na estufa a 37 °C. Em seguida foi inativado a RNase a 65 °C por 15 minutos e foi armazenado no freezer.

Anexo 12 - Obtenção das sequências parciais do gene citocromo c oxidase I

Para obtenção das sequências do gene citocromo c oxidase I (COI), utilizou os *primers* denominados de Fish F1 e Fish R1 (WARD et al. 2005). A reação de amplificação COI foi composta por 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μ M dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 μ M primers e 50 ng/mL de DNA molde. O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 55,4 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 s e, extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados e submetidos ao sequenciamento de DNA.

Anexo 13 - Purificação do produto da PCR pelo kit da GE healthcare - illustraGFX PCR DNA

A purificação seguiu o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). O protocolo consistiu na adição de 500µl de capture buffer type3 à 100 µl de amostra (10 µg) e centrifugação por 30 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, coletou o líquido do fundo do tubo que contém a amostra, transferiu para a microSpin Collumn e centrifugou por 30 segundos a 16.000 rcf. Na sequência, descartou todo o conteúdo do tubo coletor, mantendo a microSpin Collumn. Em seguida, adicionou 500µl de Wash buffer type1, centrifugou por 30 segundos a 16.000 rcf, descartou o conteúdo do tubo coletor e centrifugou novamente por 20 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, transferiu a microSpin Collumn para um microtubo novo e deixou evaporar o álcool a 70° C por 3 minutos. Após, adicionou 25µl do tampão type 6 a 70°C, aguardou 1 minuto e centrifugou por 1 minutos a 16.000 rcf. Coletou-se a solução que passou pela coluna e estocou a – 20 °C.