

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

KARINA DE ALMEIDA COELHO

ANÁLISE CROMOSSÔMICA COMPARATIVA ENTRE POPULAÇÕES DE
Apareiodon affinis (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae).

PONTA GROSSA
2014

KARINA DE ALMEIDA COELHO

ANÁLISE CROMOSSÔMICA COMPARATIVA ENTRE POPULAÇÕES DE
Apareiodon affinis (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae).

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

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

PONTA GROSSA

2014

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

C672 Coelho, Karina de Almeida
Análise cromossômica comparativa entre
populações de *Apareiodonaffinis*
(Actinopterygii: Characiformes:
Parodontidae)/ Karina de Almeida Coelho.
Ponta Grossa, 2014.
89f.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
Vicari.

Coorientador: Prof. Dr. Orlando
Moreira-Filho.

1.Citogenética. 2.Taxonomia. 3.Complexo
de espécies. 4.Marcadores cromossômicos.
I.Vicari, Marcelo Ricardo. II.
Moreira-Filho, Orlando. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576.3



PARANÁ

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. 07/2014

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 **KARINA DE ALMEIDA COELHO**.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, 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) **KARINA DE ALMEIDA COELHO**, 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. Roberto Laridondo Lui (UNIOESTE) e Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Análise Cromossômica Comparativa entre Populações de *Apareiodon affinis* (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae)**". 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, 28 de fevereiro de dois mil e quatorze

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello

Dedico este trabalho aos meus pais
Nivaldo e Giovana, a toda a minha
família e ao meu futuro esposo
Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência desafiadora e de plena superação. Remodelamo-nos a cada balbúcio em buscar respostas às nossas aflições de “pesquisador”. Para as pessoas que estão ao nosso redor, compartilhando dessa “fase”, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna concretizada graças a muitos personagens que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que sirva tudo que estamos pesquisando. É para essas pessoas especiais que desejo agradecer. Aqui vai meu muito obrigado!!!!

Quero agradecer a Deus, pela união e amor existente em minha família.

Agradeço muito e dedico a minha vida totalmente aos meus pais, Nivaldo e Giovana. Pai Careca: agradeço a você por tudo que hoje sou...se sei o que é ser uma mulher independente, de caráter e personalidade é porque me fez assim. Obrigada pelas várias conversas quando chegava chateada, desanimada da vida e você sempre me recebia com um sorriso no rosto e falava: Filha não desanima, estou sempre do seu lado!! Obrigada pelo companheirismo de toda à hora, pelas massaginhas nas costas, “por me colocar para dormir” AINDA (rs), “por me pegar no colo” AINDA (rs) e estar sempre disposto a me ajudar. Enfim por tudo, você é um exemplo de pessoa e dedicação ao próximo, é o meu orgulho, meu mantra, minha inspiração !! Desculpa esse jeito Karina turrão de ser e pelas várias vezes que te dei puxões na orelha, mesmo que no momento te deixava chateado, mas é que eu me importo muito com você! Você é minha vida, AMO VOCÊ!

Mãe Giovana: muito mais do que mãe você é minha amiga, meu escudo contra todas as coisas ruins, minha rainha, meu diamante, obrigada por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto, pelas reclamações que eram para o meu bem, pelas idas no laboratório comigo, pelas comidas maravilhosas que me fizeram engordar um pouquinho, obrigada por brigar quando estou errada, pelas risadas juntas, pelo seu colo que é meu porto seguro, pelos mimos, por estar sempre do meu lado e nunca ter desistido de mim, obrigada por conhecer meus sonhos, ouvir minhas esperanças e sentir meus problemas. Obrigada por todos os planos que você teve que adiar ou até

mesmo renunciar para que pudesse realizar os meus. Sei que no momento que estamos vivendo agora você está sentindo um misto de felicidade e angústia, pois a partir de agora sua borboleta passará a voar sozinha. Mãe quero que saiba que nada vai mudar em nossas vidas, o meu mundo não é nada se você não estiver nele. TE AMO.

Futuro marido: Acho que tudo o que eu poderia já ter dito pra você eu já disse, mas obrigada por ser o amor da minha vida, meu príncipe encantado, meu melhor amigo, meu amante, meu confidente, obrigada por dizer palavras certas em momentos difíceis, obrigada pela companhia, por ler a minha dissertação inteira além do Marcelo (rs), obrigada por fazer meus dias mais felizes, pelas palavras doces e o respeito que tem por mim, obrigada por compartilhar comigo alegrias e tristezas, por me fazer rir nas horas tristes, por me apoiar em qualquer momento. Você é quem eu escolhi para ter ao meu lado para o resto da minha vida. Te amo muito!!

Quero agradecer aos meus familiares, Francisca, Diego, Rafaela, Simone, Paulo, Vivi, Alisson, que vibraram comigo desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva ao meu respeito. Obrigada pelas alegrias, pelos encontros na casa da vó, pela coragem, pelo amor, pela força.

Obrigada a minha pequena Pamella que já não esta tão pequena assim, por se preocupar comigo, pela gratidão, pela bondade, pelos conselhos, pela amizade.....

Obrigada a Sabrina e Maria Eduarda pelas idas no laboratório, pelas risadas juntas, pelas brincadeiras....

Obrigada a Yasmim e a Gabi pelos momentos divertidos que passamos..

Meu muitoooo obrigada ao Du pelas várias dicas no photoshop, meus cariótipos não seriam nada sem você!!!! Realmente eu vi Jesus agindo rsrsrs.....

Obrigada as {SNE}'s pela amizade de 10 anos, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa.

Minha seleção, no âmbito acadêmico, deve também começar do início. A excelência profissional do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari que conferiu prestígio e valor ao meu trabalho de mestrado, pela consideração de ter aceitado me orientar, na confiança em mim depositada, obrigada pelo empenho, sabedoria, compreensão. VALEU PAI CIENTÍFICO.

Agradeço aos professores Dr. Roberto Ferreira Artoni, Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello, Dra. Viviane Nogaroto Vicari, Dr. Mateus Henrique Santos e Dr. Orlando Moreira-Filho pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, incentivo a pesquisa, competência, garra, determinação e disciplina.

Agradeço de forma especial a Michelona, amiga fiel que esteve ao meu lado em momentos cruciais do meu mestrado e por não ter me deixado desistir, sinto que percorremos este caminho juntas, nos completando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade. Mi, ainda vamos na Dona Polônia, viu?

Agradeço a minha irmã “parodontidiana” Kali, que estava desde o início sempre disposta a me ajudar de forma significativa, se tornou uma verdadeira amiga, deixando mais leve o meu trabalho...

Agradeço ao Miguel com sua frase “ Os melhores são apenas bons”, por tornar factível a realização deste trabalho, liberando todos os kits de amplificação, materiais para a FISH, vidrarias, lâminas enfim... Materiais que eu precisava, sem esquecer da sua frase falando com o seu jeitinho “meigo de ser”. “O que você quer??”.

Agradeço aos meus amigos do laboratório Alain, Leonardo, Luis, Lucas, Felipe, Jonathan, Tajiana, Diana, Bárbara, Jordana, Carol, Beatriz, Michele, Marcela, Patrícia. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem as minhas muitassss bobagenssss !!! Foi bom contar com vocês!

Agradeço a secretária Zoli, pela disponibilidade e gentileza.

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa e 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.

Finalmente agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a contribuição desse trabalho.

Obrigada galera !!!!

“Difícil não é fazer o que é certo, é descobrir o que é certo fazer”.
(Robert Henry Srouer)

RESUMO

Estudos citogenéticos básicos e moleculares foram realizados em cinco populações de *Apareidon affinis* (Parodontidae): Rio Passa Cinco, Ipeúna – SP; Rio Piracicaba, Piracicaba – SP; Rio Paraná (lago da represa de Itaipu – Santa Helena – PR) pertencentes ao sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná e duas populações da bacia do alto Rio Paraguai, rio Cuiabá, Cuiabá - MT e rio Paraguai, Cáceres - MT. A análise convencional mostrou que nas três populações do sistema alto rio Paraná apresenta $2n = 54$ cromossomos para machos e $2n = 55$ cromossomos para fêmeas. Esta diferença de número cromossômico é resultado da presença do sistema de cromossomos sexuais múltiplo com heterogamia feminina, do tipo ZZ/ZW_1W_2 . A fórmula cromossômica e número fundamental para estas três populações foi $50\ m/sm + 4\ st$, $NF = 108$ para machos e; $49\ m/sm + 6\ st$, $NF = 110$ para fêmeas. O cromossomo sexual Z é caracterizado por ser o maior cromossomo metacêntrico do complemento, enquanto os cromossomos W_1 e W_2 são subtelocêntricos com metade do tamanho do cromossomo Z. A população do rio Cuiabá, por sua vez, possui $2n = 54$ cromossomos para machos e fêmeas, fórmula cromossômica $42\ m/sm + 2\ st + 10\ a$ e; $NF = 98$ e a população do rio Paraguai não apresenta heteromorfismo de cromossomos sexuais e fórmula cariotípica $36\ m/sm + 2\ st + 16\ a$. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com DNAs ribossomais 18S e 5S foram realizadas nas diferentes populações de *A. affinis*, resultando em apenas um par cromossômico metacêntrico marcado com DNAr 5S para as populações do Alto Rio Paraná, uma situação heteromórfica com um cromossomo metacêntrico e um acrocêntrico para a população do rio Cuiabá e; um par acrocêntrico para a população do rio Paraguai. O DNAr 18S foi localizado na região terminal do braço longo de um par cromossômico subtelocêntrico, de todas as populações estudadas podendo ser considerado uma característica sinapomórfica para a família, quando comparada com o grupo irmão Anostomidae. FISH com DNA satélite pPh2004 isolado de *Parodon hilarii* também foi realizada nas populações dos sistemas hidrográficos do alto rio Paraná e bacia do rio Paraguai, evidenciando hibridação positiva em sítios diferenciais: 3 – 4 pares marcados, todos m/sm com divergência populacional no Alto Rio Paraná e, 6 – 8 pares marcados, também com divergência para as populações do rio Paraguai, em sua maioria acrocêntricos. Assim, levando em consideração as diferenças

cromossômicas entre Alto Rio Paraná e Rio Paraguai é possível afirmar a existência de uma alta diferenciação cariotípica entre as populações dos diferentes sistemas hidrográficos em isolamento de fluxo gênico. Diferenciação menor também pode ser constatada quando comparadas as localidades de um mesmo sistema hidrográfico. Deste modo, é possível afirmar que as populações de *A. affinis* do Alto Rio Paraná são divergentes, possibilitando que sua condição taxonômica seja revista.

Palavras-chave: Citogenética, taxonomia, complexo de espécies, marcadores cromossômicos.

ABSTRACT

Basic and molecular cytogenetic studies were carried out in *Apareiodon affinis* (Parodontidae) of five populations: Passa Cinco River, Ipeúna – SP; Piracicaba River, Piracicaba – SP; Paraná River (lake of the Itaipu dam - Santa Helena – PR) all belong to Upper Paraná River hidrografic system and; two localities of the Paraguay River drainage, Cuiabá River, Cuiabá - MT and, Paraguay River, Cáceres - MT. The conventional analysis showed that the three populations of the Upper Paraná River system have $2n = 54$ chromosomes to males and $2n = 55$ chromosomes to females. Those differences in the chromosome number are due to by presence of sex chromosome system showing female heterogamety ZZ/ZW₁W₂ type. The karyotypic formula and fundamental number (FN) for these three populations was 50 m/sm + 4 st. FN = 108 to males and; 49 m/sm + 6 st, FN = 110 to females. The sex chromosomes Z was characterized as the largest metacentric, while the chromosome W₁ and W₂ appears to be subtelocentrics and have half the size of the Z chromosome. In turn, the population of the Cuiabá River, Cuiabá – MT have $2n = 54$ chromosome to males and females, karyotypic formula 42 m/sm + 2 st + 10 a and FN = 98 and; the Paraguay River population show $2n = 54$ chromosomes and no heteromorphic sex chromosomes system and, karyotypic formula 36 m/sm + 2st + 16 a. Fluorescence in situ hybridizations (FISH) com 18S and 5S ribosomal DNAs were performed in the different populations of *A. affinis*, resulting in (i) a single metacentric chromosome pair bearing 5S rDNA sites for the samples on the Upper Paraná River, (ii) a heteromorphic situation of a chromosome metacentric and one acrocentric for the population of the Cuiabá River and; (iii) a acrocentric pair bearing 5S rDNA sites for the population of the Paraguay River. The 18S rDNA was found in the terminal region of the long arm of a subtelocentric pair in all populations. This situation is considered a sinapomorphic feature in Parodontidae when compared with the sister group Anostomidae. FISH with pPh2004 satellite DNA was also performed in all the populations of this study showing positive hybridization in differential sites: 3-4 pairs all m/sm in the Upper Paraná River samples and; 6-8 st/a pairs in the Paraguay River samples. Thus, the cytogenetic differences observed between Upper Paraná and Paraguay Rivers populations is possible to affirm the occurrence of a high karyotypic differentiation in gene flow restriction. Lower cytogenetic differentiation can be observed also when compared samples from the same river system. Thus, is possible to state that *A. affinis* of the Upper Paraná River population is divergent and should have their taxonomic condition reviewed.

Keywords: cytogenetics, taxonomy, species complex, chromosomal markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Destaque de parte do Mapa da América do Sul com representação da Bacia Paraná/Platina. No mapa são marcadas as regiões das antigas Setes Quedas (1), e da barragem da Usina hidrelétrica de Itaipu (2), a qual delimita as regiões denominadas Alto Rio Paraná a montante e Baixo Rio Paraná a jusante. Em 3 está representada a confluência dos rios Paraná e Paraguai, formando o denominado rio da Prata. No ponto 4 está representado a desembocadura do rio Uruguai no rio da Prata, que por sua vez, deságua no Atlântico. Fonte: LabTrans/UFSC, com modificações.	17
Figura 2. Exemplar de <i>Parodon pongoensis</i> (Familia Parodontidae) em vistas lateral e dorsal, evidenciando a morfologia fusiforme com a face ventral do corpo plana. Fonte: ALLIEN, W.R. CAS Ichthyology Primary Types Imagebase, 1943.	21
Figura 3. Exemplar de <i>Parodon pongoensis</i> (Familia Parodontidae) em vistas lateral e ventral, evidenciando o raio indiviso nas nadadeiras peitorais. Fonte: ALLIEN, W.R. CAS Ichthyology Primary Types Imagebase, 1943.	22
Figura 4. Ossos mandibulares direitos em vista medial. Em (a) <i>Parodon nasus</i> portando três dentes formados e quatro dentes de reposição; em (b) <i>Apareiodon affinis</i> e; em (c) <i>Apareiodon ibitiensis</i> com detalhe do alvéolo dentário portando um dente reduzido e três dentes vestigiais. Fonte: INGENITO, L.F.S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes), Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.	23
Figura 5. Cladograma consenso estrito das relações de Parodontidae na proposta da filogenia morfológica de Ingenito 2008. Fonte: INGENITO, L.F.S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes), Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.	24
Figura 6. Árvore consenso das relações de Parodontidae na proposta da filogenia cromossômica de Schemberger et al. (2011). Fonte: SCHEMBERGER, M.O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). Genetica, v. 139, p. 1499-1508, 2011.	25
Figura 7. Cladograma evidenciando as relações de Parodontidae na proposta de filogenia molecular usando os dados de sequenciamento de COI, Bellafronte et al. (2013). Fonte: BELLAFRONTE, E.S. et al. 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, set. 2013.	26
Figura 8. Foto de um exemplar de <i>Apareiodon affinis</i> em vista lateral. Espécime coletado da bacia do Alto rio Paraná, Rio Passa Cinco. Peixe com comprimento total 8,7cm. Foto: Orlando Moreira-Filho.	42
Figura 9. Mapa da América do Sul com destaque para a região da bacia hidrográfica do rio Paraná - Paraguai. Em (1) Rio Passa Cinco, Ipeúna – SP; (2) Rio Piracicaba, Piracicaba– SP; (3) Rio Paraná (lago de inundação de Itaipu, Santa Helana-PR) e; (4) Rio Cuiabá, Cuiabá - MT e, (5) Rio Paraguai, Cáceres –MT. Fonte: SANTOS, M.H. Hijmans, R. J., Guarino, L., Cruz, M. and Rojas, E. (2001) Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data> 1. DIVA-GIS. Plant Genetic Resources Newsletter, N. 127: 15-19.	43
Figura 10. Cariótipos de <i>Apareiodon affinis</i> do rio Passa Cinco - SP em coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 µm.	60
Figura 11. Cariótipos de <i>Apareiodon affinis</i> do rio Piracicaba - SP em coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 µm.	61
Figura 12. Cariótipos de <i>Apareiodon affinis</i> do rio Paraná – PR, localidade de Santa Helena-PR; coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 µm.	62
Figura 13. Cariótipos de fêmeas de <i>Apareiodon affinis</i> do rio Cuiabá – MT (a, b) e rio Paraguai - MT (c, d); coloração convencional por Giemsa (a e c) e, bandamento C (b e d). Barra = 10 µm.	63
Figura 14. Cariótipos de <i>Apareiodon affinis</i> submetidos à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Em (a) Rio Passa Cinco, (b) Rio Piracicaba, (c) Rio Paraná, (d) Rio Cuiabá e, (e) Rio Paraguai. Barra = 10 µm.	64
Figura 15. Cariótipos de <i>Apareiodon affinis</i> submetidos à FISH com sonda do DNA satélite pPh2004 (verde). Em (a) Rio Passa Cinco, (b) Rio Piracicaba, (c) Rio Paraná, (d) Rio Cuiabá e, (e) Rio Paraguai. Barra = 10 µm.	65

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Características gerais sobre a biologia e sistemática da Ordem Characiformes	14
1.2 Contexto geral das bacias hidrográficas do Rio Paraná, Paraguai e Uruguai	15
1.3 Caracterização da família Parodontidae	20
1.4 Citogenética da família Parodontidae.....	27
1.5 Cromossomos sexuais	31
1.6 Organização dos DNAs repetitivos	34
1.6.1 Sequências repetitivas.....	34
1.6.2 DNA codificador – Famílias multigênicas ribossomais	36
1.6.3 – DNA não codificador – DNA satélite.....	38
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Material biológico e locais de coleta.....	42
3.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos	43
3.2.1 Preparações Diretas	43
3.3 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas – BSG (SUMNER, 1972).....	44
3.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	45
3.4.1 Preparação das sondas	45
3.4.2 Marcação das sondas	45
3.4.3 Preparação das lâminas para FISH (lavagens pré hibridação)	45
3.4.4 Preparação da solução de hibridação	46
3.4.5 Hibridação e detecção dos sinais correspondentes (lavagens pós-hibridação)	46
3.5 Análises cariotípicas	47
4 RESULTADOS	48
4.1 <i>Apareiodon affinis</i> (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae) constitui um único taxa?	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e Métodos	53
Resultados	54
Discussão	56
Agradecimentos	59
5. REFERÊNCIAS	68
6. ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais sobre a biologia e sistemática da Ordem Characiformes

Os peixes representam o maior grupo de vertebrados existente, com cerca de 32.500 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2013). Na América do Sul, o número de peixes de água doce pode chegar a 5000, que, juntamente com a América Central, representa uma das mais diversificadas e ricas ictiofaunas, englobando aproximadamente 8000 espécies descritas, representando cerca de 25% de toda a diversidade de peixes do mundo (BOLHKE; WEITZMANN; MENEZES, 1978; LOWE-MCCONNELL, 1999; ESCHMEYER; FONG, 2013).

Entre os Ostariophysis, os componentes da ordem Characiformes são os peixes com maior diversidade morfológica, as quais têm sido fontes valiosas de informações para a filogenia desse grupo. De acordo com BUCKUP (1998), a ordem Characiformes compreende 18 famílias, mas suas relações de parentesco são pobremente conhecidas e a monofilia em muitos grupos é incerta. Estão agrupados em Characiformes: Chilodontidae, Distichodontidae, Citharinidae, Curimatidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Lebiasinidae, Anostomidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae (NELSON, 2006). Entretanto, dois grandes grupos monofiléticos podem ser reconhecidos nos Characiformes, Distichodontoidei e Characoidei, este último incluindo a família Parodontidae (BUCKUP, 1998).

A ordem Characiformes tem distribuição biogeográfica em regiões tropicais e subtropicais. Ainda, o confinamento de Characiformes em habitats exclusivamente dulcícolas os torna intimamente ligados à dinâmica da história geológica, e frequentemente são alvos de levantamentos sobre a história biogeográfica de faunas de água doce (MYERS, 2001). Characiformes africanos e neotropicais não parecem formar grupos monofiléticos e Buckup (1991) destacou a intolerância a salinidade entre os peixes desta ordem. Dessa forma Lundberg (1993) sugere que a origem da maioria dos grandes clados deve ter suscedido à separação continental entre África e Américas (Sul e Central). Os Characiformes com sua maior diversidade na região

Neotropical representam aproximadamente 43% das espécies de peixes de água-doce na Amazônia e cerca de 30% das espécies de peixes neotropicais.

Nesta região Neotropical a gama de especializações tróficas encontradas entre Characiformes é comparável aos ciclídeos e inclui peixes detritívoros, herbívoros, planctofagia e predatismo (ORTÍ; MEYER, 1997). Algumas espécies possuem adaptações morfológicas e fisiológicas de sobrevivência em condições de hipóxia, comuns a ambientes inundados (ORTÍ; MEYER, 1997). Sua morfologia externa é específica, além do corpo recoberto por escamas ctenoides, a excessão da cabeça, possuem características que os diferenciam dos demais grupos, tais como: presença de uma nadadeira adiposa; 5 a 12 raios moles nas nadadeiras; pré-maxilar fixo ao crânio e nadadeiras pélvicas (ventrais) situadas geralmente bem atrás da inserção das peitorais (BRITSKI et al., 2007).

1.2 Contexto geral das bacias hidrográficas do Rio Paraná, Paraguai e Uruguai

A diversidade de organismos em ambientes de água doce brasileiros deve-se à presença de grandes sistemas hidrográficos com relevante distinção ictiofaunística. Esta distinção da ictiofauna se deve à restrição do fluxo gênico imposta pelo isolamento geográfico na origem dos grandes sistemas hidrográficos. A maioria dos peixes que habitam esses ambientes pertence ao grupo dos Actinopterygii, onde as cinco maiores ordens (Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Gymnotiformes) detêm 95% das espécies dos peixes conhecidos no Brasil (ROSA; LIMA, 2008).

O Brasil apresenta o maior número de peixes de água doce do mundo, compreendendo 2.587 espécies catalogadas, e considera-se que este número possa ser subestimado (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). Provavelmente 30 a 40% dos peixes neotropicais de água doce não foram descritos e, sendo assim, a diversidade de peixes continentais para as águas brasileiras pode atingir 5.000 espécies (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Este elevado número de espécies faz com que os peixes neotropicais representem 13% da biodiversidade total de vertebrados, embora ocorram em menos de 0.003% (por volume) dos ecossistemas aquáticos do mundo (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005).

A caracterização da bacia hidrográfica torna-se indispensável para a percepção de mecanismos que ocorrem neste meio e, posteriormente, desenvolver

projetos visando à dinâmica ambiental local (SANTOS et al., 2012). Bacias hidrográficas são conjuntos de terras, limitadas por regiões mais altas do relevo que constituem os divisores de águas, conduzindo as precipitações de um ponto mais elevado para uma região abaixo, promovendo a formação de afluentes, acarretando em um curso de água principal (PARANÁ, 2010). É um meio físico passível de ações hidrológicas devido a processos de evapotranspiração, regimes pluviométricos, capacidade de escoamento superficial, bem como até o seu exutório (LIMA, 2008).

Considerada a segunda maior bacia da América do Sul, a bacia do Rio Paraná, principal formador da bacia Platina, esta 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 879.860 km² (AGOSTINHO; JÚLIO, 1999; LOWE-MCCONNELL, 1999). Esta bacia drena uma imensa área ao sul do escudo brasileiro e ao longo do seu curso recebe inúmeros grandes rios: Grande, Iguaçu, Paranaíba, Paranapanema, Tiête, entre outros (LUNDBERG, 1998). A bacia do Rio Paraná se divide em duas grandes regiões denominadas, Alto Rio Paraná e Baixo Rio Paraná (BRASIL, 2013). Mais ao sul, a bacia do Rio Paraná e o Rio Paraguai unidos aos Rios Uruguai e Prata constituem a bacia Platina (SOUZA, 1993). O Sistema do Alto Rio Paraná (doravante Alto Paraná) inclui toda a drenagem do Rio Paraná (Figura 1) à montante do antigo Salto de Sete Quedas (agora inundado pelo Reservatório de Itaipu) (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988). Com aproximadamente 900 mil km², essa porção da bacia é representada por domínios morfoclimáticos que incluem Florestas Estacionais Semidecíduais, Cerrados, Florestas Ombrófilas Mistas, Campos Rupestres e Matas de Galeria (HUECK; SEIBERT, 1981). O Alto Paraná abriga cerca de 310 espécies de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007). Apesar da ictiofauna do Alto Paraná ser uma das mais conhecidas e estudadas, o número de espécies descritas ou referidas para a área tem crescido exponencialmente, o que indica que a riqueza apresentada está longe de representar a realidade (LANGEANI et al., 2007).



Figura 1. Destaque de parte do Mapa da América do Sul com representação da Bacia Paraná/Platina. No mapa são marcadas as regiões das antigas Sete Quedas (1), e da barragem da Usina hidrelétrica de Itaipu (2), a qual delimita as regiões denominadas Alto Rio Paraná a montante e Baixo Rio Paraná a jusante. Em 3 está representada a confluência dos rios Paraná e Paraguai, formando o denominado rio da Prata. No ponto 4 está representado a desembocadura do rio Uruguai no rio da Prata, que por sua vez, deságua no Atlântico. Fonte: LabTrans/UFSC, com modificações.

Na bacia do Rio Paraná, os saltos de Sete Quedas eram uma importante barreira geográfica situada no município de Guaíra – Paraná, que delimitavam duas províncias ictiofaunísticas distintas (BONETTO, 1986), ou seja, a do Alto Paraná (da confluência dos Rios Paranaíba e Grande até as antigas Sete Quedas) e Parano-Platense (das antigas Sete Quedas até a foz do Rio Iguaçu), também chamado médio Paraná (AGOSTINHO; JÚLIO, 1999; LOWE-MCCONNELL, 1999; GRAÇA; PAVANELLI, 2007; LANGEANI, 2007). Com a formação da hidrelétrica de Itaipu e consequente inundação dos Saltos de Sete Quedas (Guaíra-Pr) a barreira geográfica ficou deslocada   barragem da usina (  150 quil metros abaixo em Foz do Iguaçu-PR), permitindo uma notável dispersão de espécies do médio Paraná para os trechos a montante (LOMWE-MCCONNELL, 1999). Por exemplo, cardumes de dourado e curimba não vistos na região acima de Guaíra passaram a utilizar o Rio Piquiri (localizado acima dos antigos Saltos) como área de desova (AGOSTINHO et al., 1993). Apesar desta evidência, não se dispõe de levantamentos ictiofaunísticos prévios com abrangência suficiente para quantificar essas introduções, embora a eficácia da barreira representada por Sete Quedas para a subida dos peixes seja ainda discutida, é aceito que pelo menos em anos de grandes cheias, algumas espécies mais arrojadas conseguiam transpô-la (LOMWE-MC CONNELL, 1999).

O sistema do Baixo Rio Paraná pertence à região ictiofaunística do Paraná (GÉRY, 1969) inclui o sistema dos Rios da Plata-Uruguai-Paraná-Paraguai (BRITSKI; LANGEANI, 1988; MENEZES, 1988; WEITZMAN; LANGEANI, 1988; LANGEANI, 1990; MENEZES, 1996; CASTRO; CASSATI, 1997). A área como um todo se localiza na face sul do Escudo Brasileiro e inclui frações dos domínios morfoclimáticos dos Cerrados, Planaltos de Araucárias e Tropical Úmido, bem como as regiões de transição correspondentes entre eles (AB' SÁBER, 1977). Quanto à fitogeografia, a região abrange áreas pertencentes às províncias Atlântica e Central (RIZZINI, 1997) com vegetação caracterizada por Florestas Subtropicais Decíduas e Mesofíticas, Cerrados, Florestas de Araucárias, Campos Rupestres e Matas de Galeria.

Outro importante formador da bacia Parano-Platense na sua região Noroeste é o rio Paraguai. Este rio, desde sua nascente, na região de Diamantino (MT), até sua confluência com o Rio Paraná, em Corrientes – Argentina detém 2.621 km de extensão no sentido norte-sul e uma área de drenagem de 1.095.000 km², sendo 33% no Brasil e o restante na Bolívia, Paraguai e Argentina. A região hidrográfica do Paraguai compreende, no território brasileiro, uma área de 362.259 km² dos quais 52% correspondem ao Mato Grosso e 48% ao Mato Grosso do Sul. 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 (Figura 1), que é caracterizada por abranger um dos maiores divisores de águas entre a Bacia Amazônica e a Bacia do Paraguai-Paraná (SAMPAIO, 2008).

O Rio Paraguai, confere à extensa planície de inundação do Pantanal, tendo uma grande variedade de fauna e flora, procedentes de regiões da Amazônia, do Chaco, do Cerrado e da Mata Atlântica, que contribuem para sua diversidade biológica. Os principais formadores do Rio Paraguai são os Rios Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Miranda e Negro, todos pela margem esquerda. De modo geral, o Rio Paraguai e seus tributários têm drenagem lenta quando descem do planalto e encontram a planície (ALHO, 2003). Esses rios, ao entrarem no Pantanal, sofrem drástica redução de velocidade, decorrente da brusca mudança de declividade da linha de água (KAWATAKE, 2006).

O clima na bacia do Rio Paraguai varia muito, ficando cada vez mais seco e sazonal no sentido leste/oeste e norte/sul. Nas regiões norte e nordeste, o clima é tropical, com chuvas abundantes no verão e períodos de estiagem de três ou quatro meses. Na porção sudeste, predomina o clima subtropical com influência de frentes

frias no inverno. As regiões centro-sul e sudeste têm clima seco, com forte sazonalidade na distribuição das chuvas. À medida que o relevo se eleva na borda leste dos Andes, a umidade diminui e, nas porções mais altas, predomina um clima semidesértico (WWF, 2012).

Ao sudeste da bacia Parano-Platense incorpora-se a drenagem do rio Uruguai (Figura 1), a qual abrange uma área de 384.000 km², dos quais 176.000 km² situam-se em território brasileiro, compreendendo 46.000 km² no Estado de Santa Catarina e 130.000 km² no Estado do Rio Grande do Sul. A bacia se estende entre os paralelos 27° e 34° Sul e 49°30' e 58°15' Oeste, 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).

O Rio Uruguai nasce da confluência dos rios Canoas e Pelotas, acima do nível do mar, percorrendo um total de 2.262 km até desembocar no estuário da Plata, do qual fazem parte o Rio Paraná e Rio Paraguai, o qual, por fim deságua no Atlântico. Na porção inicial ele 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).

A fauna de peixes do rio Uruguai é similar à do Rio Paraná, porém, foram identificadas apenas 251 espécies (HAHN; PAVANELLI; OKADA, 2000). A espécie mais abundante e intensamente pescada na região é o *Prochilodus lineatus* (curimba ou curimbatá), seguido de *Schizodon nasutus* (ximborê) e *Pterodoras granulosus* (abotoado), podendo se destacar também outras espécies migratórias de interesse comercial e esportivo, como *Salminus brasiliensis* e *Luciopmenlodus pati* (pati). As espécies migradoras presentes no baixo Rio Uruguai parecem adaptadas a usar a boca dos afluentes como áreas de criação, em virtude da ausência de ambientes de várzea ideais ao crescimento de larvas (CAROLSFIED et al., 2003). Na região do médio Uruguai limita-se a descrição feita por Bertoletti et al. (1989), onde foram encontradas 71 espécies. Desta forma, o estudo comparativo de populações da espécie *Apareiodon affinis*, a qual é descrita morfológicamente para toda a Bacia do Plata é de importância para a citotaxonomia e entendimento da história evolutiva destes peixes.

1.3 Caracterização da família Parodontidae

A família Parodontidae Eigenmann (1910) é representada por um pequeno grupo de peixes neotropicais reunidos em três gêneros (*Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916) com 32 espécies válidas sendo destas 15 pertencentes ao gênero *Apareiodon*, 14 ao gênero *Parodon* e 3 ao gênero *Saccodon* (ESCHMEYER; FONG, 2013).

A distribuição geográfica desta família de peixes é exclusiva à região Neotropical (PAVANELLI, 2003; PAVANELLI; BRITSKI, 2003). O gênero *Saccodon* possui uma distribuição mais restrita ao norte do Continente Sul Americano, sendo encontrado na bacia costeira no Panamá, Colômbia e Equador (ROBERTS, 1974). Por sua vez, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* estão distribuídos por todo o continente sul americano, com exceção das bacias do Atlântico Sul, Patagônia e canal do Rio Amazonas (PAVANELLI; BRITSKI, 2003).

A família Parodontidae no que concerne a sua formação é um grupo sustentado por caracteres morfológicos bem definidos (TRAVASSOS, 1955; ROBERTS, 1974; PAVANELLI, 2003; 2007). Suas espécies podem ser facilmente diagnosticadas dos demais Characiformes por possuírem boca inferior com mandíbula espatulada e desprovida de dentes anterior, dentes pré-maxilares pedunculados com borda distal larga, multicuspidada e distribuídos em uma única série, e pela ausência de lábio superior (PAVANELLI; BRITSKI, 2003). Entretanto, as diferenças morfológicas descritas entre os três gêneros estão relacionadas com a coloração do corpo e o padrão dentário, o que leva a questionamentos quanto ao agrupamento das espécies (INGENITO, 2008). Representantes dessa família apresentam morfologia externa fusiforme, com face ventral plana (Figura 2) comumente conhecidos como “peixe-charuto”, “virolitos”, “canivetes” ou “rollizos”, encontrados em ambientes lóticos de riachos de cabeceira (PAVANELLI, 2003).



Figura 2. Exemplar de *Parodon pongoensis* (Familia Parodontidae) em vistas lateral e dorsal, evidenciando a morfologia fusiforme com a face ventral do corpo plana. Fonte: ALLIEN, W.R. CAS Ichthyology Primary Types Imagebase, 1943.

Os três gêneros da família Parodontidae são tradicionalmente caracterizados pela variação de dois caracteres: número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais (um raio em *Parodon* e *Apareiodon* e dois em *Saccodon*) (Figura 3) e ausência de dentes na região látero-posterior da mandíbula em *Apareiodon* e *Saccodon* (Figura 4) (PAVANELLI, 1999). Incertezas quanto a agrupamento de espécies de Parodontidae nos respectivos gêneros são antigas, Shultz e Miles (1943) indagavam a legitimidade de *Apareiodon* em razão da ausência de dentes em espécimes juvenis de *Parodon*, a exemplo de *P. pongoensis*, descrito no gênero *Apareiodon* e, em seguida, destinado ao gênero *Parodon* devido à descoberta de dois pequenos dentes mandibulares no holótipo (SHULTZ; MILES, 1943). Desta forma, diante da ausência de caracteres robustos ocorrem questionamentos para a classificação das espécies nos gêneros de Parodontidae (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO; BUCKUP, 2005; VICARI et al., 2006a, INGENITO, 2008).



Figura 3. Exemplar de *Parodon pongoensis* (Familia Parodontidae) em vistas lateral e ventral, evidenciando o raio indiviso nas nadadeiras peitorais. Fonte: ALLIEN, W.R. CAS Ichthyology Primary Types Imagebase, 1943.

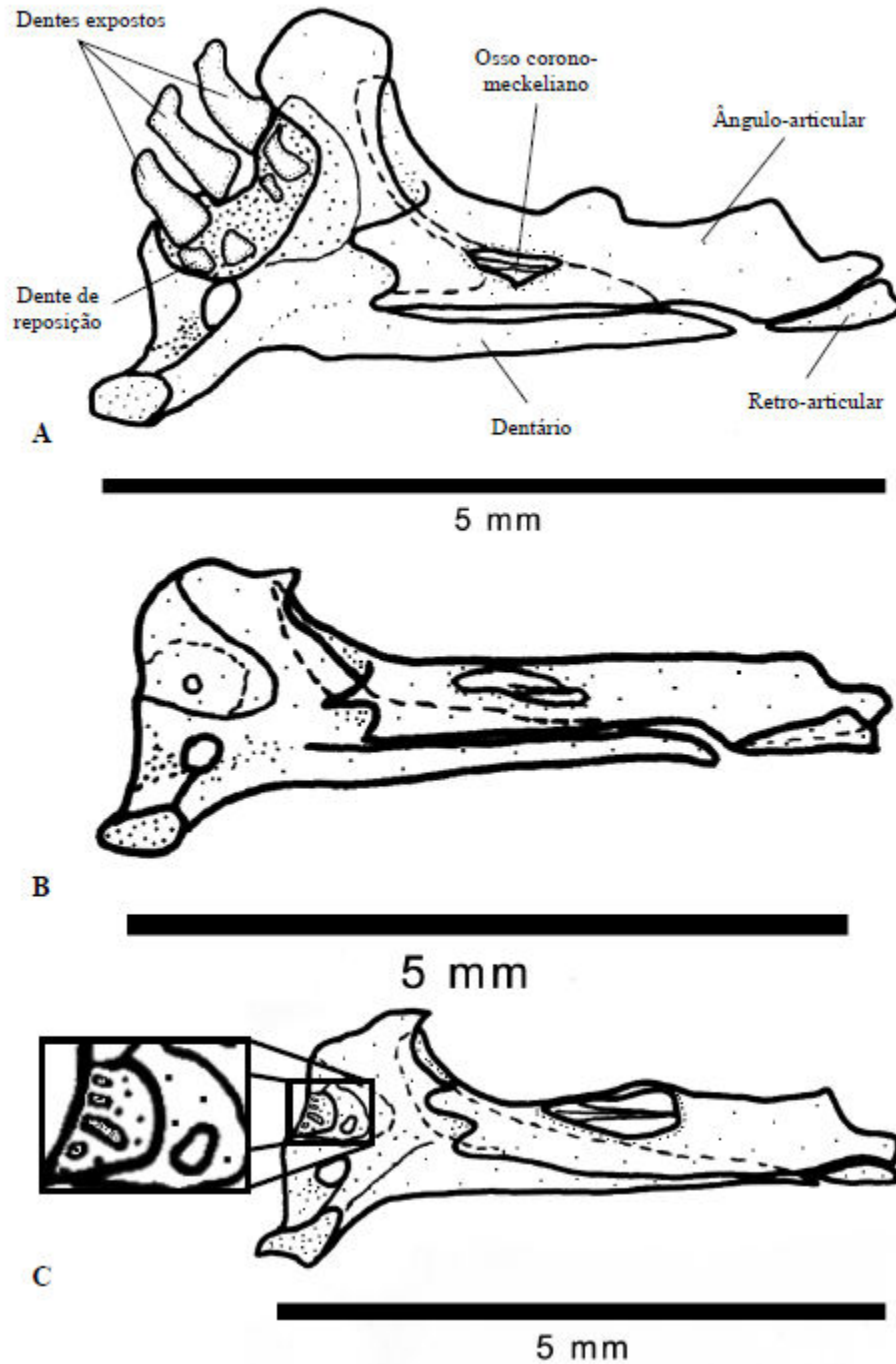


Figura 4. Ossos mandibulares direitos em vista medial. Em (a) *Parodon nasus* portando três dentes formados e quatro dentes de reposição; em (b) *Apareiodon affinis* e; em (c) *Apareiodon ibitiensis* com detalhe do alvéolo dentário portando um dente reduzido e três dentes vestigiais. Fonte: INGENITO, L.F.S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes), Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Ingenito (2008) realizou uma análise filogenética com o método cladístico de parcimônia utilizando caracteres osteológicos e morfológicos, onde considerou *Saccodon* grupo irmão de *Parodon* e não encontrou evidências filogenéticas que sustentassem a manutenção do gênero *Apareiodon*, o qual foi considerado sinônimo

júnior de *Parodon*. Dentro desta proposta, o gênero *Parodon*, em sua nova possível delimitação, é sustentado por pelo menos nove sinapomorfias exclusivas dentro de Parodontidae (Figura 5).

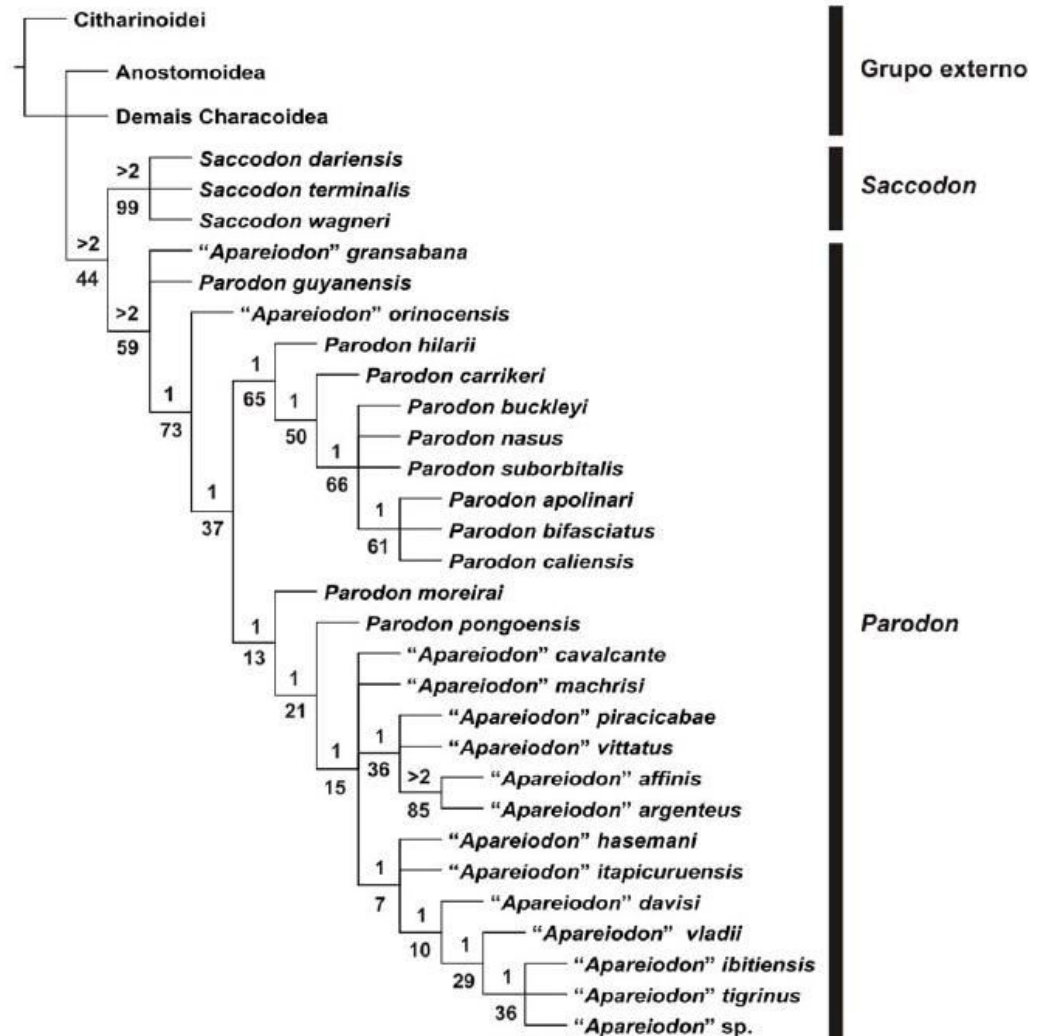


Figura 5. Cladograma consenso estrito das relações de Parodontidae na proposta da filogenia morfológica de Ingenito 2008. Fonte: INGENITO, L.F.S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes), Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Por sua vez, uma análise de agrupamento baseada em caracteres cromossômicos evidencia que espécies de *Parodon* estão mais relacionadas entre si quando comparadas à *Apareiodon*, a exceção de *A. affinis* (Figura 6), que provavelmente divergiu de uma linhagem de *Parodon* (SCHEMBERGER et al., 2011). Estudos com sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de espécies do gênero *Parodon* e *Apareiodon* mostraram a ocorrência de dois

clados bem sustentados (Figura 7), corroborando a manutenção destes dois gêneros (BELLAFRONTTE et al., 2013).

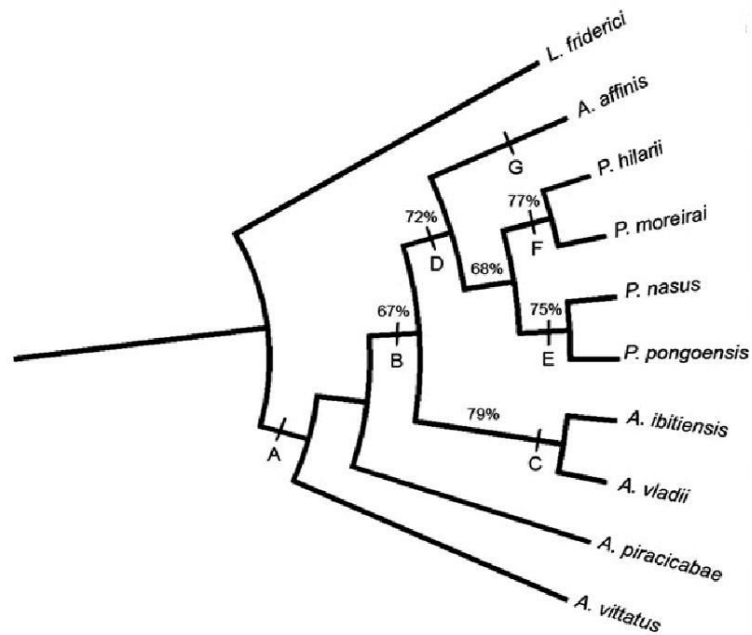


Figura 6. Árvore consenso das relações de Parodontidae na proposta da filogenia cromossômica de Schemberger et al. (2011). Fonte: SCHEMBERGER, M.O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica*, v. 139, p. 1499-1508, 2011.

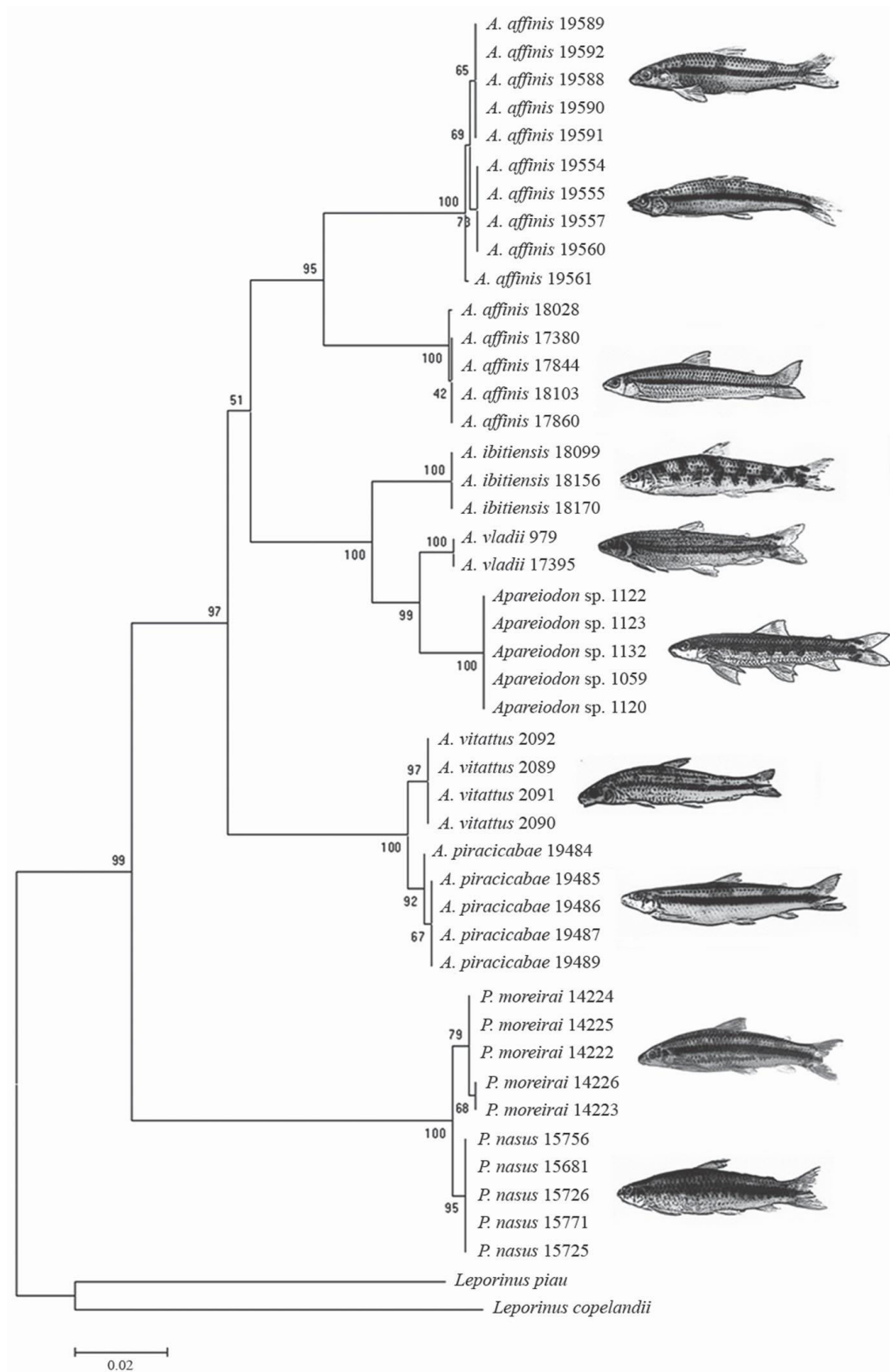


Figura 7. Cladograma evidenciando as relações de Parodontidae na proposta de filogenia molecular usando os dados de sequenciamento de COI, Bellafronte et al. (2013). Fonte: BELLAFRONTE, E.S. et al. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin applying new data to clarify taxonomic problems. Neotropical Ichthyology, v. 11, n. 3, p. 497-506, set. 2013.

Entre as características morfológicas para a diagnose de *A. affinis* estão: forma retangular verticalmente alongada, borda cortante dos dentes pré-maxilares reta e arestas arredondadas, ângulo-articular alto, margem dorsal do ângulo articular fortemente côncava, ausência de elemento terminal no final da sequência de raios das nadadeira dorsal e caudal, processo isquiático curto, lamela óssea desenvolvida, rastros branquiais mais largos nos arcos brânquias 2 e 3.

1.4 Citogenética da família Parodontidae

Dados citogenéticos já foram publicados para 11 espécies dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, sendo: *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. hasemani*, *A. affinis*, *P. nasus*, *P. pongoensis*, *P. hilarii*, *P. moreirai* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000 a,b; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000, 2004; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTE et al., 2009, 2011, 2012; SCHEMBERGER et al., 2011). As análises cromossômicas nestes dois gêneros revelaram um número diploide conservado de 54 cromossomos, mas com considerável heterogeneidade em relação à distribuição de heterocromatina, atividade das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), número e localização dos sítios de DNAr 18S, 5S e de famílias de DNA satélite, e presença de sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (para uma revisão ver BELLAFRONTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011).

Entre os Parodontidae, os sítios de regiões organizadoras de nucléolo detectados por prata (Ag-RONs) e por hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda de rDNA 18S estão localizados na região terminal do braço longo de um grande par cromossômico subtelocêntrico em todas as espécies de *Apareiodon* já estudadas (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2004, ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTE et al., 2009, 2011, 2012), com sítios adicionais observados em algumas populações de *A. ibitiensis* e *A. vittatus* (BELLAFRONTE et al., 2009; 2011). Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONs têm sido localizadas tanto em cromossomos subtelocêntricos, como em cromossomos submetacêntricos (VICENTE et al., 2001; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTE; MARGARIDO; MOREIRA-

FILHO, 2005), bem como em condição sintênica ao rDNA 5S em *P. nasus* (BELLAFRONTTE; MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2005). Em Anostomidae, grupo irmão de Parodontidae, o sítio das RONS se localiza, na maioria das espécies, em região terminal de um par meta/submetacêntrico (GALETTI et al., 1991). Essa condição é similar àquela verificada para as espécies do gênero *Parodon*, com exceção de *P. nasus* e todas as espécies de *Apareiodon* estudadas, as quais apresentam sítios de rDNA 18S possivelmente em localização derivada para este marcador dentro da família Parodontidae.

No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima à região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos (CENTOFANTE et al., 2002; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTTE et al., 2009, 2011, 2012), marcação que é homeóloga a encontrada em um par cromossômico da família Anostomidae (MARTINS; GALETTI, 1999). Entretanto, sítios adicionais com localizações variáveis podem ocorrer em algumas espécies do gênero *Parodon*, além da provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com a heterocromatina GC-rica em alguns representantes da família (VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTTE; MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2005; VICARI et al., 2006a).

O traço marcante da diferenciação nesta família de peixes é a presença de sistemas de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW e múltiplo ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980, 1993; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). Entre as espécies já analisadas citogeneticamente, sete delas apresentaram sistemas de cromossomos sexuais: ZZ/ZW₁W₂ para *A. affinis* (sistema do Alto Rio Paraná) e ZZ/ZW para as espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis* e *A. hasemani* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTTE et al. 2009, 2011, 2012; SCHEMBERGER et al., 2011).

A localização da heterocromatina nos cromossomos de Parodontidae é observada principalmente nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas e, alguns blocos terminais de poucos cromossomos do complemento (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1984; 1993; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2004; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTTE et al. 2009, 2011, 2012). Por sua vez, a heterocromatina é um marcador útil na identificação dos

cromossomos sexuais ZZ/ZW dos parodontídeos (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002). O cromossomo Z apresenta pequenos blocos heterocromáticos, sendo um proximal e outro terminal no braço curto (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; VICARI et al., 2006a) para a maioria das espécies. O cromossomo W detém, além do pequeno bloco terminal, um bloco heterocromático maior em sua região intersticial responsável por tornar esta região em braço maior quando comparado ao cromossomo Z (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; VICARI et al., 2006a). Desta forma, a pequena região heterocromática proximal do braço curto existente no cromossomo Z corresponde ao braço longo do cromossomo W, a exceção de *A. hasemani* (BELLAFRONTTE et al., 2012).

Em Parodontidae, os DNA satélites têm tido ampla importância no entendimento da evolução cariotípica. Até o momento, dois DNAs satélites foram descritos: o DNAs satélites pPh2004 (VICENTE et al., 2003) e WAp (SCHEMBERGER et al., 2011). Vicente et al. (2003) isolaram e identificaram a família de DNA satélite pPh2004 em *P. hilarii*, sendo constituída de uma sequência monomérica composta de 200 pb com 60% de bases AT. O mapeamento físico da sequência pPh2004 mostra que este DNA satélite está presente nos cromossomos Z e W de espécies do gênero *Parodon* (além de cromossomos autossomos), no entanto, não faz parte da região heterocromática amplificada do cromossomo W (BELLAFRONTTE et al., 2011). Este DNA satélite foi visualizado na região terminal do proto cromossomo sexual de *P. pongoensis*, em 8 sítios autossômicos e nos proto cromossomos sexuais de *P. nasus*, em dois sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW de *P. moreirai*, em 14 sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW de *P. hilarii*, além de ser encontrado em seis sítios autossômicos de *A. affinis* do Alto Rio Paraná (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). *Apareiodon affinis* é a única espécie do gênero, até o momento, a apresentar o DNA satélite pPh2004, sendo que os sítios são observados em ambas as regiões terminais do cromossomo 2 e na região terminal do braço longo do cromossomo 13 (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011).

Por sua vez, o DNA satélite WAp é capaz de detectar a região de amplificação e heteromorfismo do cromossomo W, corroborando a origem comum deste sistema em Parodontidae, além de apresentar localização em outros sítios cromossômicos (SCHEMBERGER et al., 2011). Este DNA repetitivo foi obtido por microdissecção de metáfases C bandadas para identificação do bloco

heterocromático de diferenciação do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (VICARI et al., 2010) e subsequente amplificação por 'Degenerate Oligonucleotide Primed / Polimerase Chain Reaction' (DOP-PCR). Com a localização por FISH da sequência WAp nas demais espécies de Parodontidae foi possível determinar que o sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW teve origem por uma inversão paracêntrica de um sítio terminal da sonda WAp para a região proximal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta sequência levando a diferenciação do cromossomo sexual W na maioria das espécies (SCHEMBERGER et al., 2011).

Em uma análise de todos os conjuntos de marcadores cromossômicos de Parodontidae, Schemberger et al. (2011) propuseram grupos de espécies próximas constituídos de: espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos (*A. piracicabae* e *A. vittatus*); com proto cromossomos sexuais e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. nasus* e *P. pongoensis*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (*Apareidon* 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 com sistema de cromossomos sexuais múltiplos e DNA satélite pPh2004 (*A. affinis*). Dessa forma, os principais marcadores cromossômicos até então mapeados que tem atuado na diversificação cromossômica têm sido os DNAs repetitivos pPh2004 e WAp juntamente com a diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos.

A origem de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, na maior parte dos casos, se dá por rearranjos de cromossomo sexual simples e autossomos (WHITE, 1973). Em *A. affinis*, existem duas propostas de origem do sistema sexual ZZ/ZW₁W₂: a primeira considera que rearranjos do tipo fissão cêntrica e inversão pericêntrica do primeiro par metacêntrico originaram os cromossomos W₁ e W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980); a segunda 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 (1980).

Apareidon affinis (Steindachner, 1879) foi descrita para a bacia do Rio da Prata (Argentina) e análises citogenéticas da sua localidade tipo não foram conduzidas, no entanto, populações do Baixo Rio Paraná não apresentam evidência de cromossomos sexuais e são caracterizadas por apresentar variação no número

de cromossomos acrocêntricos (JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000). Cromossomos acrocêntricos, em Parodontidae, são visualizados apenas nestas populações de *A. affinis* do baixo Rio Paraná e para a população da bacia do Rio Cuiabá, bacia do Rio Paraguai, Cuiabá – MT (JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000; 2004). Já a população de *A. affinis* do sistema Alto Rio Paraná foi a única a apresentar sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000). Esta espécie também é relatada para a bacia do Rio Uruguai (COPATTI; ZANINI; VALENTE, 2009), embora nenhum estudo citogenético tenha sido realizado para esta população. Desta forma, a caracterização citogenética destas e outras populações com marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos podem ser úteis na identificação deste provável caso de especiação não acompanhado por modificações das características morfológicas.

1.5 Cromossomos sexuais

Ao contrário dos mamíferos e aves, o sistema de cromossomos sexuais heteromórficos em peixes não é uma condição plesiomórfica, possuindo origens diferentes nos diversos gêneros e famílias, gerando sistemas simples distintos XX/XY, ZZ/ZW e sistemas múltiplos X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y, XX/XY₁Y₂, ZZ/ZW₁W₂, Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂ (ARTONI; BERTOLLO, 2002; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1993; OLIVEIRA et al., 2008; SCHEMBERGER et al., 2011, entre outros).

A distinção dos sistemas cromossômicos de determinação do sexo refere-se ao sexo heterogamético: heterogamia feminina (ZZ/ZW) e heterogamia masculina (XX/XY). As fêmeas de mamíferos apresentam cromossomos sexuais homomórficos (XX) e os machos heteromórficos (XY). Situação inversa é observada em aves e algumas cobras onde ocorrem sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (MATSUBARA et al., 2006). Clark e Wall (1996) relataram que os anfíbios apresentam sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, XX/XY e espécies sem sistemas de cromossomos sexuais diferenciados.

Entre os vertebrados, a origem de um sistema de cromossomos sexuais está principalmente relacionada à diferenciação de um par autossômico que passa a ser denominado de proto cromossomos sexuais (MATSUBARA et al., 2006). A etapa essencial para o início da diferenciação dos cromossomos sexuais é a supressão de

recombinação entre homólogos (NEI, 1969). Para promover a supressão da recombinação cromossômica entre os proto cromossomos sexuais, rearranjos cromossômicos do tipo inversão, translocação e heterocromatização são os mecanismos principais (CLARK; WALL, 1996), além do extensivo acúmulo de elementos transponíveis (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005).

Com a supressão da recombinação e o início da diferenciação dos proto cromossomos sexuais ocorre intensa degeneração do Y/W e consequente decréscimo da função dos locos da região heteromórfica (MÜLLER, 1932). Dois são os fatores para a ocorrência de sua degeneração: erosão da atividade gênica e mudanças de regiões eucromáticas para heterocromatina. Uma das possibilidades para a heterocromatização do Y/W é derivada da inserção de elementos transponíveis e DNAs satélites resultando em um padrão de replicação tardio relativo ao seu homólogo (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; MARAIS, 2005), facilitando a ausência ou baixa frequência de recombinação (NANDA et al, 2000). O aumento da supressão da recombinação entre homólogos e degeneração do cromossomo Y/W também pode ser ocasionada pelas mudanças cromossômicas estruturais tais como inversões peri/paracêntricas (NANDA et al., 2000).

Os cromossomos sexuais múltiplos de invertebrados são originados a partir de rearranjos cromossômicos envolvendo autossomos e os sistemas de cromossomos sexuais simples (WHITE, 1973; SMITH; VIRKK, 1978; SCHNEIDER et al., 2006, entre outros). Entretanto, especificamente em peixes Neotropicais foram descritos alguns mecanismos de origem de cromossomos sexuais múltiplos sem evidências de um estágio intermediário de cromossomos sexuais simples heteromórficos (BERTOLLO et al., 1997; BERTOLLO; MESTRINER, 1998; OLIVEIRA et al., 2008).

Quanto a origem dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos em peixes, embora não ocorram evidências para todos os sistemas múltiplos descritos, sua origem provavelmente está relacionada à translocação autossomo com o cromossomo sexual simples em estágio inicial de diferenciação. Este processo está atrelado aos sistemas ZZ/ZW e alguns sistemas XX/XY em peixes, os quais tem aumento substancial do tamanho do cromossomo W/Y por acúmulo de DNAs repetitivos, os quais inviabilizariam a estabilidade da meiose em um sistema de cromossomos sexuais múltiplos (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980). Nesse caso, para a manutenção de uma estrutura meiótica estável dos sistemas múltiplos, essa heterocromatina do cromossomo W/Y deveria ser perdida durante o

evento de origem; ou o surgimento do sistema múltiplo pode ter ocorrido já em etapas iniciais da diferenciação do cromossomo W por translocação com par autossômico (SCHEMBERGER et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Estudos relacionados à meiose de peixes Neotropicais são escassos devido ao pequeno conhecimento das etapas de maturação gonadal, da morfologia das gônadas, entre outros. Silva et al. (2011) relataram a importância das análises meióticas para demonstrar a ocorrência de cromossomos sexuais em peixes, bem como o comportamento durante a divisão celular e a formação de gametas. O comportamento meiótico do sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ da espécie de *Hoplias malabaricus* foi descrito por Bertollo e Mestriner (1998). Nesta espécie ocorre a formação de trivalente na fase de paquíteno de machos e a correta segregação dos cromossomos sexuais (BERTOLLO; MESTRINER, 1998).

A maioria das espécies de Gymnotiformes analisadas até o momento não apresenta sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos e foi proposto que este caráter surgiu por eventos independentes nas diferentes espécies. Em duas espécies de Gymnotiformes: *Eigenmannia* sp. e *Brachyhypopomus pinicaudatus* o mecanismo de fusão cêntrica foi utilizado para a origem do cromossomo Y no sistema múltiplo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (ALMEIDA – TOLEDO et al., 2000 a, b; SILVA; MARGARIDO, 2005). A análise dos cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em três espécies pertencentes de diferentes famílias de Gymnotiformes indicam eventos homoplásicos (SILVA; MARGARIDO, 2005).

Para estudar a origem dos sistemas sexuais em *Gymnotus pantanal* foi utilizada a análise das células meióticas durante a fase paquíteno, a qual mostrou que os elementos X_1 , X_2 e Y apresentam elevado grau de homologia, sugerindo origem recente a partir de cromossomos não diferenciados (SILVA et al., 2011). Nesta espécie foi proposto o mecanismo de fusão de autossomos para a origem do cromossomo Y do sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (SILVA; MARGARIDO, 2005), entretanto é provável a origem a partir de cromossomos sexuais indiferenciados (proto cromossomos sexuais) e autossomos (SILVA et al., 2011). Desta forma, estudos com maior número de espécies, e com emprego de métodos apropriados e de meiose tornam-se necessários para compreender a origem dos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos em peixes.

1.6 Organização dos DNAs repetitivos

1.6.1 Sequências repetitivas

Os DNAs repetitivos constituem grande porcentagem do genoma eucariótico, sem apresentar relações quanto à quantidade e complexidade do organismo, consistindo de sequências que podem ser idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes podendo estar em tandem (lado a lado) ou podem estar dispersas no genoma (TIMBERLAKE, 1978; SUMNER, 2003). Por muito tempo o DNA repetitivo foi considerado como DNA lixo (junk DNA), DNA egoísta (selfish DNA) ou DNA parasítico (parasitic DNA) (DOOLITTLE; SAPIENZA, 1980; ORGEL; CRICK, 1980; NOWAK, 1994), por falta de conhecimentos sobre suas funções. Atualmente, já se sabe que estas repetições possuem funções estruturais e organizacionais, na regulação de genes, em rearranjos cromossômicos, na replicação, no reparo de DNA, diferenciação e regulação cromossômica, podendo também estar envolvido na causa de algumas doenças (SUMNER, 2003). Estes DNAs repetitivos também possuem interesse especial em estudos de estrutura e função cromossômica, evolução, identificação de rearranjos cromossômicos, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; SUMNER, 2003; VICARI et al., 2010). São classificados de acordo com suas características principais e incluem as famílias multigênicas, as sequências não codificadoras repetidas em tandem e as sequências dispersas. As famílias multigênicas são sequências repetidas de DNA compostas por DNAs que possuem um transcrito funcional, por exemplo, têm-se as famílias compostas de centenas ou milhares de cópias de sequências, que transcrevem importantes moléculas como os RNAs ribossomais (RNAr) (LONG; DAWID, 1980; PENDÁS et al., 1994).

As sequências repetidas em tandem não transcritas são classificadas em três sub-grupos de acordo com o tamanho do seu fragmento (LEVINSON; GUTMAN, 1987): (i) sequências satélites, a grande maioria dessas sequências apresentam cerca de 100 a 300 pares de base (pb) de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 1.000 000 cópias (DNA altamente repetido) de uma sequência básica que ocorre em um ou em alguns locos nos cromossomos (TIMBERLAKWE, 1978; WALSH, 2011); (ii) Um segundo grupo das sequências organizadas em tandem

compreende os minissatélites ou sequências com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*). São repetições de aproximadamente 10 a 60 pb (DNA moderadamente repetido), encontrados em diferentes locos no genoma e agrupados nos telômeros (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985) e; (iii) o último grupo dos elementos repetidos em tandem é composto pelos microsatélites. Os microsatélites são repetições mais curtas (1 a 5 pb) do que a classe anterior e, ao menos 30.000 loci diferentes de microsatélites estão presentes no genoma (WEBER; MAY, 1989).

A classe das sequências repetidas de DNA dispersas no genoma compreende dois tipos de elementos denominados Transposons e Retrotransposons (FESCHOTTE, 2004), sendo classificados de acordo com sua organização estrutural e mecanismo de transposição. O primeiro tipo inclui os Retrotransposons ou elementos de classe I que transpõem via transcrição reversa do seu RNA. Já o segundo tipo inclui os Transposons ou elementos de classe II que se movimentam pelo genoma através de cópias do seu DNA. Diversas famílias de elementos transponíveis já foram identificadas. No genoma dos peixes podem ser encontrados todos os tipos de elementos transponíveis, sendo que alguns desses elementos já foram estudados e mapeados nos cromossomos (VOLFF et al., 2003; MARTINS, 2007; FERREIRA et al., 2011).

Aparentemente os elementos transponíveis (TEs) se associam mais facilmente as regiões de heterocromatina. Acredita-se que os TEs tendem a se acumular em regiões com baixos níveis de recombinação, como no caso de regiões heterocromáticas, pois em outras regiões os TEs poderiam ter efeito deletério; além disto, existe a possibilidade do envolvimento dos TEs na manutenção de regiões genômicas específicas, bem como regiões pericentroméricas e teloméricas (MARTINS et al., 2011). Além disto, eles promovem a formação de centro de nucleação de heterocromatina, que podem ser vistas como resposta e defesa ao acúmulo de retrotransposons no cromossomo, sendo que a partir destes centros de nucleação, a heterocromatina se espalha para regiões vizinhas (STEINEMANN; STEINEMANN, 2005).

As regiões eucromáticas, ricas em genes, podem igualmente conter algumas sequências repetitivas, mas por causar mutações prejudiciais aos genes, são eventualmente eliminadas pela pressão seletiva (DEININGER et al., 2003). Vários estudos têm sugerido o envolvimento de sequências repetidas nos processos de replicação do DNA (LI et al., 2002), recombinação (BIET; SUN; DUTREIX et

al.,1999), expressão gênica (LIU et al., 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (GALETTI JR et al., 1986; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; SCHEMBERGER et al., 2011).

Devido sua natureza egoísta e parasítica o movimento e a acumulação dos TEs são visualizados com uma forte influência na trajetória evolutiva dos genomas hospedeiros (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Inúmeras vias tem demonstrado que os TEs podem influenciar a regulação da expressão gênica, tanto no nível transcricional como pós-transcricional (FESCHOTTE, 2008). Desta forma, foi postulado que a inserção de TEs nas vizinhanças ou domínios das sequências cis regulatórias provavelmente contribuem para o estabelecimento de padrões de linhagens específicas da expressão gênica (MARIÑO-RAMÍREZ; JORDAN; LANDSMAN, 2006). Em adição para a doação de elementos cis regulatórios está a criação de novas redes regulatórias. Assim, o movimento e o acúmulo de TEs tem sido proposto participar da reestruturação de redes de regulação gênica pré estabelecidas. No peixe medaka, o qual possui determinação sexual pela ação do gene DMY foi visualizado que o promotor deste gene sofreu invasão de elementos transponíveis (HERPIN et al., 2010). Neste caso, estes elementos transponíveis forneceram uma nova rota regulatória por carrear sequências para a ligação de fatores de transcrição (HERPIN et al., op cit.).

1.6.2 DNA codificador – Famílias multigênicas ribossomais

Regiões que evoluem rapidamente são adequadas para o estudo de organismos muito próximos ou populações e aquelas que são conservadas são mais apropriadas para comparação entre táxons (ABAD-FRANCH et al., 2005). As famílias multigênicas em eucariotos superiores correspondem a um elemento estrutural comum ao genoma desse grupo, constituídas por genes com notável similaridade estrutural, tanto no número quanto na organização de pares de bases, embora possam desempenhar funções diferentes, estão presentes em múltiplas cópias, são definidas como um conjunto de genes derivados por duplicação de um gene ancestral, com 50% de semelhança, e que o acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo seja responsável pelas pequenas diferenças observadas entre seus genes. Estão organizadas em duas famílias multigênicas distintas: a 5S e 45S (MARTINS et al., 2004; ANDRADE; JORDÃO, 2005). O DNA ribossomal (DNAr) é

uma região conservada e que recentemente mostrou-se como um valioso auxílio para pesquisas de sistemática e filogenia, onde cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, podendo ser tratada como um único gene (COLEMAN, 2003; NAEGELE, da COSTA; da ROSA, 2006).

As famílias multigênicas ribossomais 45S e 5S (DNAr 45S e DNAr 5S, respectivamente), no que diz respeito a localização dos sítios cromossômicos apresentam excelente informação em relação à evolução cariotípica, sendo também utilizados na citotaxonomia (GALETTI Jr. et al., 1984; PHILLIPS; IHSEN, 1985; AMEMIYA; GOLD, 1986; FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 1992; VICARI et al., 2008). Por sua vez, a região organizadora de nucléolo (RON) corresponde ao sítio do DNAr 45S e é o local, em nível cromossômico, onde o nucléolo é organizado (HOWELL; BLACK, 1980; NAKAYAMA, 2007). Dados de RONS aparentam ser convenientes para a caracterização cariotípica dos vertebrados, evidenciando-os como marcadores cromossômicos quanto ao número, localização no cromossomo e posição no cariótipo, sendo assim essas variáveis podem ser utilizadas na diagnose de espécies, populações ou até mesmo indivíduos da mesma linhagem (GALETTI et al., 1984; PHILLIPS et al., 1985; AMEMIYA et al., 1986; FELDBERG et al., 1992).

Representantes da Ordem Characiformes como, por exemplo, Curimatidae (VENERE; GALETTI, 1989; FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 1992), Anostomidae (GALETTI et al., 1981; 1984), Prochilodontidae (PAULS; BERTOLLO, 1983; FELDBERG et al. 1987; VICARI et al., 2006b), Parodontidae (MOREIRA-FILHO et al., 1985; VICARI et al., 2006a; BELLAFRONTE et al., 2009, 2010), Hemiodontidae (PORTO et al., 1993), apresentam preferencialmente um par de cromossomos homólogos portador de RONS, entretanto exemplos como piranhas e pacus apresentam mais de um par de cromossomos com sítios organizadores de nucléolo, caracterizando um sistema de RONS múltiplas (GALETTI et al., 1985; PORTO et al., 1992; CESTARI; GALETTI, 1992; GARCIA-PARRA, 2000; NAKAYAMA et al., 2001; NAKAYAMA; PORTO; FELDBERG, 2002; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICARI et al., 2008).

O DNAr 5S é transcrito em um local diferente da região organizadora nucleolar (RON), migra para o nucléolo e se une ao RNAr 5,8S e 28S para formar a subunidade maior do ribossomo, apresenta-se conservado, mesmo entre organismos filogeneticamente distantes, incluindo os peixes, onde na maioria das vezes, ocupa uma região intersticial nos cromossomos, porém esta região codificante pode apresentar alteração em relação as sequências nucleotídicas e na

organização das unidades repetitivas nesta mesma classe (HIZUME, 1994). Cada unidade repetitiva consiste de aproximadamente 120 pares de bases intercalados por espaçador não transcrito (NTS), que é comumente variável em sua sequência nucleotídica, devido inserções/deleções, mini-repetições e pseudogenes (ANDRADE; JORDÃO, 2005; PENDÁS et al., 1994). Em peixes, a localização cromossômica dos genes de RNAr 5S tem sido de grande importância para a compreensão da estrutura e organização das sequências repetitivas nos cromossomos (MARTINS; GALETTI, 2001). Em vários organismos, os sítios de DNAr 5S estão localizados em um único par cromossômico, mas em anfíbios (VITELLI et al., 1982; SCHMID; VITELLI; BATISTONI, 1987; LUCCHINI et al., 1993), bem como em algumas espécies de peixes (MORÁN et al., 1996; FUJIWARA, 1998; MURAKAWI; FUJITANI, 1998; MARTINS; GALETTI, 1999, 2000) esses sítios podem estar localizados em vários cromossomos. Além disso, em peixes, os locos de DNAr 45S e 5S podem estar organizado de uma maneira sintênica (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VASQUES, 1993; MORAN et al., 1996; HATANAKA; GALETTI, 2004; MANTOVANI; ABEL; MOREIRA-FILHO, 2005) ou podem estar localizados em distintos pares cromossômicos (MARTÍNEZ et al., 1996; SAJDAK; REED; PHILLIPS, 1998; MARTINS; GALETTI, 1999; BORN; BERTOLLO, 2000), o que parece ser a característica mais comumente observada entre os vertebrados (LUCCHINI et al., 1993; SUZUKI, SAKURAI; MATSUDA, 1996; MARTINS; GALETTI, 2001).

1.6.3 – DNA não codificador – DNA satélite

Sequências satélites são altamente repetidas em tandem, com unidades de geralmente 100 a 300 pb de comprimento, cada uma destas unidades pode estar presente em centenas a milhares de cópias em um genoma (SUMNER et al., 1990; EPPLEN; KYAS; MAULER, 1996; TEIXEIRA, 2009). As famílias de DNA satélite podem coexistir em um mesmo organismo e diversas delas têm sido isoladas, caracterizadas e localizadas em cromossomos de muitas espécies (SILVA et al., 2011). Estão arranjadas em regiões centroméricas/pericentroméricas de um ou mais locos (JOHN; WORKMAN, 1998; CHAVES; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2004; MARTINS et al., 2006), ocasionalmente em porções intersticiais e terminais (CHARLESWORTH; SNEGOWSKI; STEPHAN, 1994; VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009). A distribuição dos DNAs satélites geralmente coincide com o padrão de

bandamento C dos cromossomos formando a maior parte da heterocromatina constitutiva, sugerindo que seja uma importante componente desta (YUNIS; YASMINEH, 1971; MIKLOS, 1985; PLOHL; LUCHETTI, 2008). O isolamento de DNAs repetitivos utilizando enzimas de restrição representa a metodologia mais comumente aplicada para identificar repetições satélites e podem ser utilizados como marcadores citomoleculares em um grande número de espécies, porém, metodologias baseadas na cinética de reassociação C_0t-1 e microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C também podem ser utilizados para a identificação de DNAs repetitivos (VICARI et al., 2010).

Com relação aos DNAs satélites a primeira descrição em peixes Neotropicais foi realizada por Haaf et al. (1993) para *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). Desde então, várias famílias de DNAs repetitivos já foram prospectadas de diferentes espécies de peixes neotropicais como, por exemplo, As51 isolado por Mestriner et al. (2000) de *Astyanax scabripinnis*; pPh2004 isolado por restrição genômica de *Parodon hilarii*, Vicente et al. (2003), SATH1 e SATH2 isolados por restrição genômica em *Prochilodus lineatus* (JESUS et al., 2003), 5SHindIII isoladas de *Hoplias malabaricus* (MARTINS et al., 2006), Al-HindIII isolado de *Achirus lineatus* por Azevedo et al. (2005); elemento repetitivo LeSpel isolado do genoma de *Leporinus elongatus* (PARISE-MALTEMPI et al., 2007); retroelemento RCK isolado de *Cichla kelberi* (TEIXEIRA et al., 2009); WAp da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (VICARI et al., 2010); sonda oriunda de cromossomos B de *Prochilodus lineatus* (VOLTOLIN et al., 2010).

Na família Parodontidae há estudos com DNA satélite obtido por digestão do DNA genômico com Eco RI de *Parodon hilarii* (VICENTE et al., 2003). A hibridação fluorescente *in situ* evidenciou sítios em *P. hilarri* (VICENTE et al., 2003) e em *P. moreirai*, citado como *Parodon* sp. (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002), *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* (BELLAFRONTI et al., 2011) presentes na região terminal de alguns cromossomos do complemento, incluindo os cromossomos sexuais das espécies *Parodon hilarii* e *Parodon moreirai* e os proto cromossomos sexuais das espécies *P. pongoensis* e *P. nasus* (SCHEMBERGER et al., 2011).

Deste modo, estudos acerca da composição e distribuição de diferentes famílias de DNAs satélites em peixes poderá fornecer maiores contribuições à caracterização genética de diferentes espécies, podendo promover informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências

espécie-específicas e/ou cromossomo específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002), assim como estudos filogenéticos (PONS; GILLESPIE, 2002; PONS; PETITPIERRE; JUAN, 2003; KANTEK et al., 2009) compreendendo a evolução do genoma dos peixes, com especial foco em domínios de heterocromatina.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos citogenéticos convencionais com populações de *Apareiodon affinis* das bacias hidrográficas do sistema Alto Rio Paraná, sistema Baixo Rio Paraná e Rio Cuiabá, da bacia do Rio Paraguai indicaram diferenças citogenéticas consistentes com a existência de espécies diferentes sob a designação de um mesmo taxa. Quanto às características morfológicas, até o presente momento, populações deste grupo *A. affinis* não apresentam diferenças suficientes para a descrição de novas espécies. Na citogenética, a população de *A. affinis* do sistema do Baixo Rio Paraná não apresenta cromossomos sexuais diferenciados e detém um polimorfismo de cromossomos acrocêntricos (JORGE; MOREIRA- FILHO, 2000). Na região do Rio Cuiabá, bacia do Rio Paraguai, também não é observado cromossomos sexuais diferenciados para *A. affinis*, no entanto, são caracterizados cinco pares de cromossomos acrocêntricos, morfologia cromossômica não identificada em nenhum outro representante da família (JORGE; MOREIRA- FILHO, 2000). Por sua vez, populações de *A. affinis* do sistema Alto Rio Paraná evidenciam um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂. (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a). Neste aspecto, a utilização de marcadores cromossômicos por citogenética molecular podem ser uteis no esclarecimento das relações evolutivas das diferentes populações de *A. affinis*.

Objetivo geral do projeto foi:

Comparar a organização cariotípica de *Apareiodon affinis* de diferentes sistemas hidrográficos utilizando os marcadores cromossômicos clássicos e moleculares, com objetivo de estudar os mecanismos de diferenciação cromossômica neste grupo, para verificar a existência de um complexo de espécies.

Objetivos específicos e metas:

1. Caracterizar cromossomicamente populações de diferentes sistemas hidrográficos da espécie *Apareiodon affinis* com marcadores cromossômicos clássicos;
2. Diferenciar as populações de *A. affinis* utilizando marcadores cromossômicos por hibridação *in situ* fluorescente (FISH);

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico e locais de coleta

Foram estudadas citogeneticamente 105 exemplares de *Apareiodon affinis* (Figura 8) coletados nas regiões do sistema do Alto Rio Paraná e bacia do rio Paraguai. No sistema do Alto Rio Paraná foram estudadas três populações: rio Passa Cinco, Ipeúna-SP (16 fêmeas e 15 machos); Rio Piracicaba, Piracicaba-SP (12 fêmeas e 8 machos); rio Paraná, Represa do lago de Itaipu Santa Helena– PR (13 fêmeas e 14 machos). Para a bacia do Rio Paraguai foram analisadas duas populações: rio Cuiabá- Cuiabá – MT (6 fêmeas e 5 machos) e; Rio Paraguai, Cáceres-MT (9 fêmeas e 7 machos) (Figura 9). O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1 – ANEXO 1). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo CEUA: 07/2011; ANEXO 2).

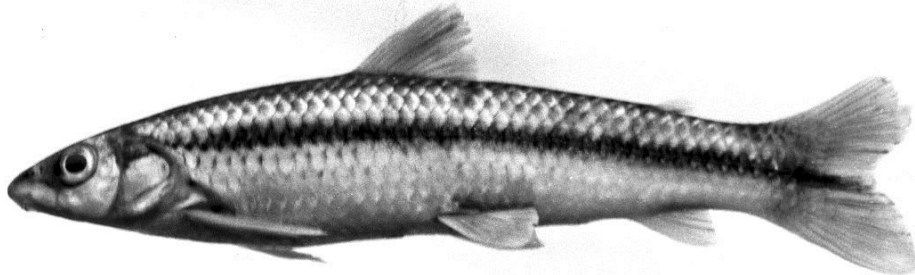


Figura 8. Foto de um exemplar de *Apareiodon affinis* em vista lateral. Espécime coletado da bacia do Alto rio Paraná, Rio Passa Cinco. Peixe com comprimento total 8,7cm. Foto: Orlando Moreira-Filho.

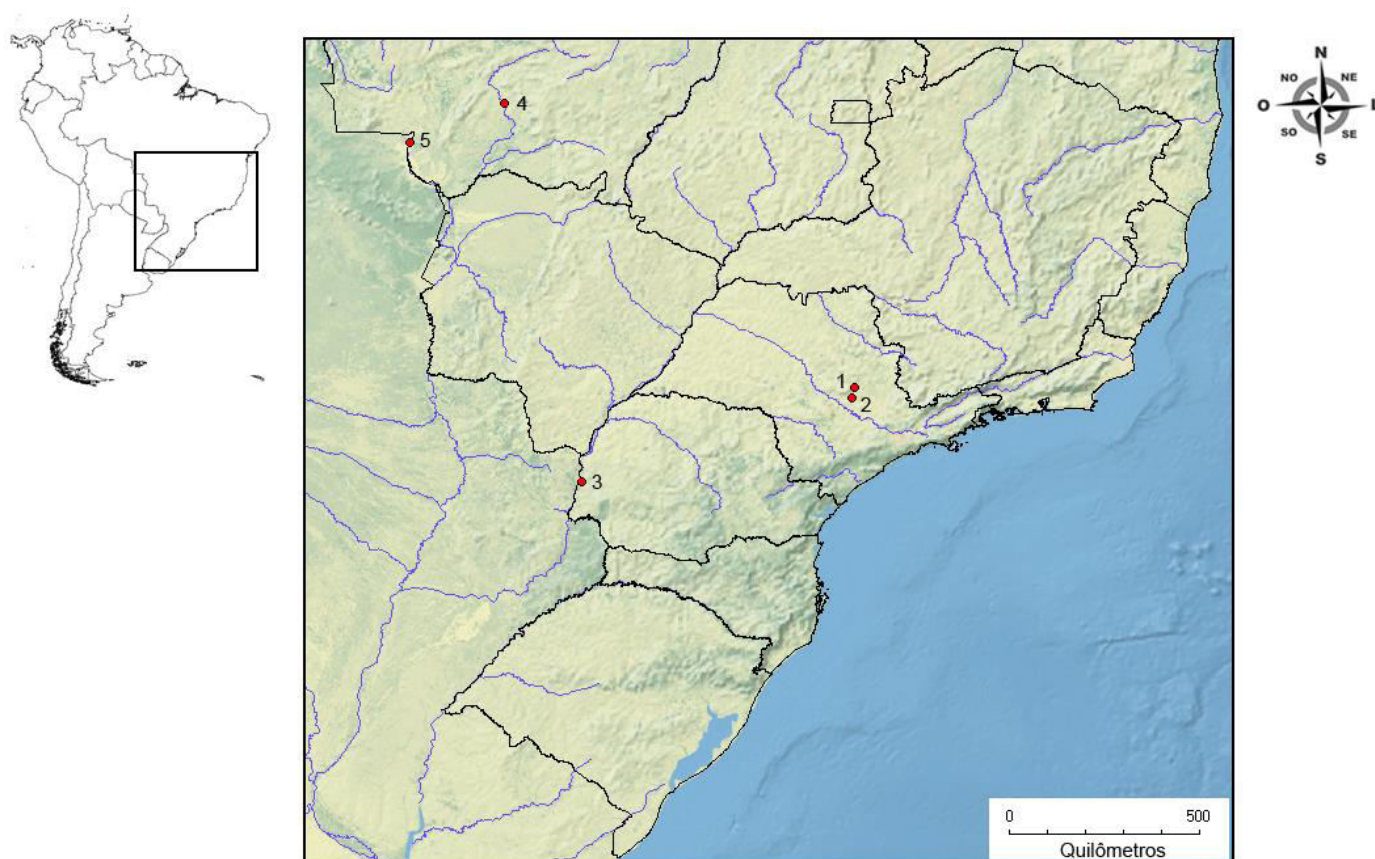


Figura 9. Mapa da América do Sul com destaque para a região da bacia hidrográfica do rio Paraná - Paraguai. Em (1) Rio Passa Cinco, Ipeúna – SP; (2) Rio Piracicaba, Piracicaba– SP; (3) Rio Paraná (lago de inundação de Itaipu, Santa Helena-PR) e; (4) Rio Cuiabá, Cuiabá - MT e, (5) Rio Paraguai, Cáceres –MT. Fonte: SANTOS, M.H. Hijmans, R. J., Guarino, L., Cruz, M. and Rojas, E. (2001) Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data> 1. DIVA-GIS. Plant Genetic Resources Newsletter, N. 127: 15-19.

3.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

3.2.1 *Preparações Diretas*

Para a obtenção dos cromossômicos mitóticos foi utilizado o método convencional de “air-dring”, a partir de uma suspensão celular hipotonizada e fixada, adaptada por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). Na intenção de aumentar o número de células em divisões mitóticas as mesmas foram estimuladas pela ação de leveduras por meio de uma injeção subcutânea de uma solução de fermento biológico sacarosado (5g fermento; 3g sacarose: 10 ml de água destilada), 1 ml para cada 100 g de peso do animal (LEE; ELDER, 1980). Após 24 horas da ação dessa solução foi aplicado intraperitonalmente uma solução de colchicina (0,0125% - 1 ml para cada 100 g do peso corporal), após este procedimento o peixe foi mantido em

aquário bem aerado durante 50-60 minutos. Após este período o exemplar foi colocado em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0,01%, sacrificando o mesmo para remoção do rim. Pedacos do rim anterior foram transferidos para uma cubeta de vidro contendo 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e com o auxílio de duas pinças o material foi fragmentado e após divulsionado com uma seringa de vidro até obter uma solução homogênea. Esta solução foi então incubada a 37°C em estufa por um período de 25-30 minutos. Passado este período a suspensão foi transferida para um tubo de fundo cônico e centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm. Com um auxílio de uma pipeta Pasteur o sobrenadante foi descartado com a manutenção do botão de células. Sobre este botão de células foram adicionados 10 mL de fixador (3:1 metanol e ácido acético respectivamente, recém-preparado), ressuspendendo o material repetidas vezes com uma pipeta Pasteur, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm. Esta etapa de trocas de fixadores foi repetida por mais 2 vezes. Na última centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 1,5 mL de fixador (3:1). O material foi ressuspendido e armazenado em freezer (- 20°C) para posterior análise. Para a observação do material foram utilizadas lâminas de vidro armazenadas em solução ácida (10% ácido clorídrico, 90% etanol), as quais foram lavadas em água corrente utilizando sabão neutro. A suspensão celular com o material biológico foi gotejada (1 – 2 gotas) com auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina levemente inclinada e com uma película d'água a uma temperatura de 55-60°C. Após secas as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5%, em tampão fosfato pH = 6,8 durante 6-8 minutos.

3.3 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas – BSG (SUMNER, 1972)

Para a observação da heterocromatina constitutiva as lâminas com o material foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl 0,2N) por 10 minutos a 37°C e, posteriormente, lavadas em água destilada. Depois foram incubadas a temperatura ambiente, de 1 a 2 minutos, em solução de Hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5%), recém preparado. Após este procedimento, foram realizadas duas lavagens rápidas nas lâminas: a primeira em HCl 0,2 N e a segunda em água destilada, sendo incubadas então, em solução salina de Citrato de Sódio (2xSSC) a 60°C durante 45 minutos. A seguir foram coradas em solução de Giemsa tamponada a 2% (pH 6,8) por 15 minutos e analisadas ao microscópio de campo claro.

3.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) teve como base os procedimentos adotados por Pinkel; Straume e Gray. (1986), com implementação de algumas adaptações pelo Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

3.4.1 Preparação das sondas

Foram empregados três tipos de sondas para a localização dessas sequências nos cromossomos metafásicos das populações de *Apareiodon affinis* estudadas: (1) uma sonda do rDNA 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA et al., 2004); (2) uma sonda do rDNA 5S obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI, 1999); (3) uma sonda de DNA repetitivo pPh2004, isolada a partir da digestão enzimática do peixe *Parodon hilarii* (VICENTE et al., 2003).

3.4.2 Marcação das sondas

As sondas do DNA ribossômico 18S e do DNA satélite pPh2004 foram marcadas por meio da reação de “Nick Translation” (Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante (ANEXO 3) utilizando os compostos digoxigenina 11-dUTP e biotina 16-dUTP, respectivamente. A sonda do rDNA 5S foi marcada com a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 16-dUTP, Roche Applied Science) (ANEXO 4).

3.4.3 Preparação das lâminas para FISH (lavagens pré hibridação)

Nas lâminas, devidamente limpas, foi gotejada a suspensão celular. Quando secas, as mesmas foram lavadas em solução de tampão salino fosfato (PBS), por

um período de 5 minutos, sob agitação. Depois, foram desidratadas em série alcoólica a 70 v/v, 85 v/v e 100 v/v, por um período de 5 minutos, respectivamente. Na sequência, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/mL) durante 1 hora em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução salina de citrato de sódio 2 vezes concentrada (2xSSC), por 5 minutos (sob agitação), e uma vez em PBS, pelo mesmo período. Após foi realizada uma fixação em formaldeído 1% /PBS/ MgCl₂ 50 mM, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Na sequência foi realizada uma nova lavagem em PBS por 5 minutos. Em seguida uma série de desidratação em etanol 70 v/v, 85 v/v e 100 v/v, respectivamente, foram realizadas por um período de 5 minutos cada. Posteriormente, o material cromossômico foi desnaturado com formamida 70%, dissolvida em 30 mL de 2xSSC, a uma temperatura de 70°C, por um período de 5 minutos, e em seguida, repetidas as três desidratações em etanol.

3.4.4 Preparação da solução de hibridação

A mistura de hibridação foi constituída de 200 µl de Formamida (50% de Formamida); 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µl de 20xSSC (concentração final 2xSSC), 1 µg de cada sonda marcada diluídas em 80 µl de água destilada, totalizando 400 µl (aconselhável para 8 lâminas). A solução de hibridação foi então desnaturada a 100°C durante 10 minutos e imediatamente transferidos para um recipiente com gelo.

3.4.5 Hibridação e detecção dos sinais correspondentes (lavagens pós-hibridação)

Procedendo a hidridação, foi adicionado 50 µl da mistura de hibridação desnaturada sobre a lamínula, invertendo a lâmina sobre a lamínula, mantendo as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (água destilada a 37°C por 16h). Em seguida as lâminas foram lavadas em Tween 0,05%/ 4xSSC, por 5 minutos (sob agitação), incubadas em 100 µl de tampão de leite em pó desnatado (*non fat dry milk* - NFDM) a 5%, por 15 minutos em temperatura ambiente, e duas lavagens com Tween 0,05%/ 4X SSC, 5 minutos cada. A detecção do sinal da sonda foi realizada com uma mistura de 100 µl de tampão NFDM contendo 1:200 de anti digoxigenina rodamina a 1 µg/mL e/ou, 1:500 de estreptavidina alexa flúor 488 a 1

µg/mL, permanecendo por 1 hora a 37°C em câmara úmida. As lâminas hibridizadas foram lavadas 3 vezes em Tween, 5 minutos cada. Em seguida as lâminas foram desidratadas em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 100 v/v, 5 minutos cada, e secas ao ar. Após isso, as lâminas foram montadas com solução de 1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid (antifade) e 4,6 Diamino 2-Fenil-Indol (DAPI 2 µg/mL).

3.5 Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência (Olympus BX41), com os filtros apropriados. As imagens foram capturadas utilizando a câmera CCD DP71 (Olympus) e o software DP Controller (Olympus). As melhores fotos foram utilizadas 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). Considerando a similaridade morfológica e uma melhor distribuição no cariótipo, os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos constituíram um único grupo cromossômico e os elementos classificados como subtelocêntricos e acrocêntricos formaram um segundo grupo de cromossomos.

4 RESULTADOS

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

Capítulo I

4.1 *Apareiodon affinis* (Actinopterygii: Characiformes: Parodontidae) constitui um único taxa?

Resumo

Parodontidae é um grupo de peixes com distribuição Neotropical que apresenta incertezas quanto ao real agrupamento das espécies nos seus gêneros e quanto a distinção morfológica de algumas espécies. *Apareiodon affinis* tem localidade tipo para o Rio da Prata (Argentina), porém sua distribuição se dá por toda a drenagem Parano-Platense que inclui o Alto Rio Paraná e rios da Prata, Uruguai, Baixo Paraná e Paraguai. O Alto Rio Paraná foi mantido em isolamento geográfico dos demais rios pelas Sete Quedas, inundada em 1982, com a construção da represa de Itaipu. Análises genéticas em *A. affinis* das regiões do Alto Rio Paraná quando comparadas ao Baixo Rio Paraná, Prata, Uruguai e Paraguai não corroboram a morfologia quanto a manunção de um único taxa. Com base nestes dados, este estudo comparou citogeneticamente três localidades de *A. affinis* do Alto Rio Paraná e duas localidades da bacia do Rio Paraguai. Os resultados para as populações do Alto Rio Paraná mostraram um número diploide $2n = 54$ cromossomos para machos e $2n = 55$ para fêmeas e um sistema de cromossomo sexual múltiplo com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW₁W₂. Por sua vez, as populações da bacia do Rio Paraguai possuem $2n = 54$ cromossomos, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais, e uma variação de fórmula cromossômica devido à ocorrência de cromossomos acrocêntricos oriundos de inversão pericêntrica. Marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos também evidenciaram divergência para as diferentes localidades de uma mesma bacia hidrográfica e, principalmente, alta diferenciação em número e localização de sítios em relação a estes marcadores cromossômicos quando comparadas as populações do Alto Rio Paraná às do Rio Paraguai. Assim, levando em consideração que a diferenciação cromossômica entre Alto Rio Paraná e Rio Paraguai são consistentes com espécies distintas, *A. affinis* do Alto Rio Paraná deveria ter sua condição taxonômica revista.

Palavras – chave: marcadores cromossômicos, taxonomia, sistemática, DNAs repetitivos, diferenciação cromossômica.

Abstract

Parodontidae is a Neotropical fish group that presents controversial taxonomy relationship because the family members lack diagnostic morphological traits reliable enough to support accurate phylogenetic analysis and species identification. *Apareiodon affinis* have type locality for the Plata River (Argentina) but its distribution range in all Parano-Platense drainage that includes Upper Paraná River and Plata, Uruguay, Low Paraná and Paraguay rivers. The Upper Paraná River was maintained in geographic isolation of the others rivers by Sete Quedas Falls, currently inundated by the Itaipu hydroelectric dam that keeps the flow gene restriction. Comparative genetic analysis in *A. affinis* between Upper Paraná River and Low Paraná River, Prata, Uruguay and Paraguay did not sustained morphological data to maintain just one taxa. Due to these data, in this study were cytogenetically compared three samples of *Apareiodon affinis* of the Upper Paraná River system, and two samples of the Paraguay River drainage. The results show $2n = 54$ chromosomes to males, $2n = 55$ chromosomes to females and sex chromosome system ZZ/ZW_1W_2 to the Upper Paraná River population. On the other hand, Paraguay River populations have $2n = 54$ chromosome, no heteromorphic sex chromosomes system, and an intense variation of chromosome formula due to the occurrence of acrocentric chromosomes derived from pericentric inversion. Chromosomal markers of the repetitive DNAs also showed differentiation among the samples of the same drainage, and especially a high divergence for repetitive DNAs sites number and localization between Upper Paraná and Paraguay Rivers populations. Hence, the results evidenced that the chromosomal divergence between Upper Paraná and Paraguay rivers populations are consistent with the occurrence of two species and *A. affinis* of the Upper Paraná River population should have their taxonomic condition reviewed.

Keywords: chromosomal markers, taxonomy, systematic, repeats DNAs, chromosomal differentiation

Introdução

A família Parodontidae Eigenmann (1910) é representada por um grupo de peixes neotropicais reunidos em três gêneros (*Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916) com 32 espécies válidas, sendo destas 15 pertencentes ao gênero *Apareiodon*, 14 ao gênero *Parodon* e 3 ao gênero *Saccodon* (ESCHMEYER; FONG, 2013). Os três gêneros da família Parodontidae são tradicionalmente caracterizados pela variação de dois caracteres: número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais (um raio em *Parodon* e *Apareiodon* e dois em *Saccodon*) e ausência de dentes na região látero-posterior da mandíbula em *Apareiodon* e *Saccodon* (PAVANELLI, 1999).

As análises cromossômicas nos gêneros *Apareiodon* e *Parodon* mostram um número diploide conservado de 54 cromossomos, mas com considerável heterogeneidade em relação aos marcadores cromossômicos (para revisão ver BELLAFRONTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). O maior interesse nos estudos cromossômicos de Parodontidae é a presença dos sistemas de cromossomos sexuais, onde, das 11 espécies estudadas até o momento, *A. piracicabae* e *A. vittatus* e (*A. affinis* - populações do Baixo Rio Paraná e Rio Paraguai) não apresentaram heteromorfismo de cromossomos sexuais; *P. pongoensis* e *P. nasus* apresentaram proto cromossomos sexuais, *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. hasemani*, *A. vladii*, *P. moreirai* e *P. hilarii* apresentaram heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW e *A. affinis* (população do Alto Rio Paraná) apresentou sistema de cromossomos sexuais múltiplo ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980, 1993; CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006a; SCHEMBERGER et al., 2011; BELLAFRONTE et al., 2012).

Os marcadores citogenéticos tem contribuído com a taxonomia e sistemática do grupo de peixes neotropicais, contribuindo com a indicação de sinonímia (BELLAFRONTE; MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2005), com a ocorrência de complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; ARTONI et al., 2006), indicação de novas taxa (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006a; 2008; PUCCI et al., 2014), entre outros. Em Parodontidae, os marcadores cromossômicos mais utilizados são os DNAs ribossomais, o DNA satélite pPh2004 descrito por Vicente et al. (2003) e, a sonda da

fração heterocromática do cromossomo sexual de *Apareiodon* sp., denominada WAp (VICARI et al., 2010).

Em *Apareiodon* o rDNA 18S está localizado na região terminal do braço longo de um grande par cromossômico subtelocêntrico, com sítios adicionais observados em algumas populações de *A. ibitiensis* e *A. vittatus*. Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS têm sido localizadas tanto em cromossomos subtelocêntricos, como em cromossomos submetacêntricos, bem como em condição sintênica ao rDNA 5S em *P. nasus*. No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima à região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos. O DNA satélite pPh2004 descrito por Vicente et al. (2003) foi visualizado na região terminal do proto cromossomo sexual e nos cromossomos sexuais no gênero *Parodon*, além de sítios autossômicos. *Apareiodon affinis*, população do Alto Rio Paraná, até o momento, é a única espécie deste gênero a apresentar o DNA satélite pPh2004 (para uma revisão ver BELLAFRONTE et al., 2011). Por sua vez, a sonda WAp é verificada na região de acúmulo de DNA repetitivo do cromossomo W, na região heterocromática do cromossomo Z e também nos cromossomos sexuais W_1 e W_2 de *A. affinis* do Alto Rio Paraná (SCHEMBERGER et al., 2011).

O sistema hidrográfico Parano-Platense é formado pelas drenagens dos rios Paraná, Prata, Uruguai e Paraguai. Os saltos das Sete Quedas formavam uma importante barreira geográfica para a dispersão de espécies isolando duas províncias ictiofaunísticas: o Alto Rio Paraná e, a região do Baixo Rio Paraná, Rio Uruguai e Rio Paraguai. Com a construção da hidroelétrica de Itaipu as Sete Quedas foram inundadas e a barreira para dispersão passou a ser estabelecida pela barragem da represa (BONETTO, 1986, BRITSKI; LANGEANI, 1988). O taxa *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879) tem localidade tipo descrita para La Prata, província de Buenos Aires, bacia do Rio da Prata (Argentina). Análises citogenéticas de *A. affinis* desta região não foram realizadas, no entanto, populações de *A. affinis* próximas, do Baixo Rio Paraná possuem $2n = 54$ cromossomos, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais e são caracterizadas por apresentar variação no número de cromossomos acrocêntricos. Cromossomos acrocêntricos, em Parodontidae, são visualizados apenas nestas populações de *A. affinis*. Por sua vez, a população do rio Paraguai, a qual integra o sistema Prata-Uruguai-Paraná-Paraguai, possui $2n = 54$ cromossomos, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais, sendo 5 pares de cromossomos acrocêntricos (JESUS; BERTOLLO;

MOREIRA-FILHO, 1999; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000; 2004). Esta espécie também é relatada para a bacia do Rio Uruguai (COPATTI; ZANINI; VALENTE, 2009), embora nenhum estudo citogenético tenha sido realizado para esta população. Já as populações de *A. affinis* do sistema Alto Rio Paraná foram as únicas a apresentar sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO; GALETTI, 1980; SCHEMBERGER et al., 2011).

Análises de sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I evidenciou uma divergência de 0,3% entre populações de *A. affinis* do rio Paraguai e Uruguai, e estas divergiram em 6,1% da população do Alto Rio Paraná (BELLAFRONTTE et al., 2013). Com base neste cenário, o presente trabalho tem como objetivo comparar a organização cariotípica de *Apareiodon affinis* de diferentes sistemas hidrográficos utilizando os marcadores cromossômicos clássicos e de citogenética molecular para o entendimento dos mecanismos de diferenciação cromossômica neste grupo. Além disso, contrapor os dados de agrupamentos citogenéticos e moleculares aos dados morfológicos para verificar a ocorrência de diferentes espécies sob a mesma designação de taxa.

Material e Métodos

Foram estudadas citogeneticamente 105 exemplares de *Apareiodon affinis* coletados nas regiões do sistema do Alto Rio Paraná e bacia do rio Paraguai. No sistema do Alto Rio Paraná foram estudadas três populações: rio Passa Cinco, Ipeúna-SP (16 fêmeas e 15 machos); Rio Piracicaba, Piracicaba-SP (12 fêmeas e 8 machos); rio Paraná, Represa do lago de Itaipu Santa Helena– PR (13 fêmeas e 14 machos). Para a bacia do Rio Paraguai foram analisadas duas populações: rio Cuiabá- Cuiabá – MT (6 fêmeas e 5 machos) e; Rio Paraguai, Cáceres-MT (9 fêmeas e 7 machos) (Figura 9).

O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza e, neste, realizado o método convencional de suspensão celular hipotonizada e fixada, adaptada por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). A heterocromatina constitutiva foi localizada pela técnica de (SUMNER, 1972). Foram utilizados três tipos de sondas para a localização de sequências nos cromossomos metafásicos das populações de *A. affinis* empregando a metodologia de hibridação

in situ fluorescente (FISH): (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; GALETTI., 2004); (2) uma sonda de rDNA 5S, obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI Jr., 1999); (3) uma sonda de DNA repetitivo, isolada a partir de digestão enzimática do peixe *Parodon hilarii* denominada pPh2004 (VICENTE et al., 2003). As sondas de rDNA 5S e pPh2004 foram marcadas com biotina e a sonda do rDNA 18S com digoxigenina pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16-dUTP e digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science).

O procedimento geral da FISH seguiu o descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos streptavidina alexa flúor 488 (Molecular Probes) e anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência (Olympus BX41), com os filtros apropriados. As imagens foram capturadas utilizando a câmera CCD DP71 (Olympus) e o software DP Controller. As melhores foram utilizadas 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).

Resultados

A análise de citogenética convencional mostrou que as populações do sistema Alto Rio Paraná possui $2n = 54$ cromossomos para machos e $2n = 55$ cromossomos para fêmeas (Figuras 10, 11 e 12). Esta diferença de número cromossômico é caracterizada pela presença do sistema de cromossomos sexuais múltiplo com heterogamia feminina, do tipo ZZ/ZW_1W_2 (Figuras 10, 11 e 12). A fórmula cromossômica e número fundamental para estas três populações foi $50\ m/sm + 4\ st$, $NF = 108$ para machos e $49\ m/sm + 6\ st$, $NF = 110$ para fêmeas (Figuras 10, 11e 12). O cromossomo sexual Z é caracterizado por ser o maior cromossomo metacêntrico do complemento, enquanto os cromossomos W_1 e W_2 são subtelocêntricos com metade do tamanho do cromossomo Z (Figuras 10, 11e

12). Por sua vez, a população do rio Cuiabá, possui $2n = 54$ cromossomos para machos e fêmeas, fórmula cromossômica $42 m/sm + 2 st + 10 a e$; $NF = 98$ (Figura 13) e a população do rio Paraguai possui $2n = 54$ cromossomos, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais e fórmula cromossômica $36 m/sm + 2 st + 16 a$ (Figura 13).

A análise do bandamento C dos cromossomos dos representantes de *A. affinis* do Rio Passa Cinco evidenciou blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, além de bandas terminais nos braços curto e longo dos cromossomos Z, W_1 e W_2 (Figura 10). Para a população do Rio Piracicaba, além de todos os cromossomos com bandas pericentroméricas foram visualizadas bandas nas regiões terminais dos cromossomos do par número 2, 7 e sexuais Z, W_1 e W_2 (Figura 11). Na população do Rio Paraná, foram observados blocos heterocromáticos pericentroméricos em todos os cromossomos e nas regiões terminais dos cromossomos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 27, Z, W_1 e W_2 (Figura 12). O bandamento C para os exemplares do Rio Cuiabá evidenciou 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 acrocêntrico 26 (Figura 13). Já a população do rio Paraguai apresentou bandas pericentroméricas em quase todos os cromossomos do complemento e pequenas bandas intersticiais de alguns pares acrocêntricos (Figura 13).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda de DNAr 18S nas cinco populações de *Apareiodon affinis* localizou um sítio ribossômico na região terminal do braço longo de um par subtelocêntrico (Figura 14). A FISH com sonda de DNAr 5S revelou apenas um par cromossômico marcado, na região proximal do braço curto de um par metacêntrico em todas as populações de *affinis* do Alto Rio Paraná (Figura 14 a; b; c). As amostragens da população do rio Paraguai apresentaram uma variação, onde os sítios do rDNA 5S estão localizados em um par heteromórfico com um cromossomo metacêntrico e outro acrocêntrico (Rio Cuiabá) (Figura 14 d); e a população do rio Paraguai apresentou os sítios de rDNA 5S em região intersticial de um par acrocêntrico (Figura 14 e).

A FISH com a sonda pPh2004, evidenciou número de sítios diferenciais nos cromossomos das populações estudadas. Para as localidades dos Rios Passa Cinco e Piracicaba foram encontrados 3 pares marcados: par metacêntrico 2 em ambas as regiões terminais e pares submetacêntricos 5 e 23 em região terminal do braço

longo (Figura 15 a; b). Por sua vez, a população do Rio Paraná (lago da represa de Itaipu), além destes três pares marcados, o par submetacêntrico 14 também apresentou a região terminal do braço longo marcada (Figura 15 c). *Apareiodon affinis* do Rio Cuiabá, Cuiabá - MT apresentou seis pares marcados com a sonda pPh2004, sendo os 5 pares acrocêntricos mais um par submetacêntrico (Figura 15 d). A população do rio Paraguai apresentou 8 pares cromossômicos marcados, todos acrocêntricos (Figura 15 e).

Discussão

O estudo citogenético comparativo entre as populações de *A. affinis* da região da bacia do Alto Rio Paraná (Rio Passa Cinco, Rio Piracicaba e Rio Paraná, Represa do lago de Itaipu) e bacia do Rio Paraguai (Rios Cuiabá e Paraguai) evidenciaram diferenças cariotípicas consistentes com diferenciação populacional em isolamento geográfico. As três amostragens de *A. affinis* da região da bacia do Alto Rio Paraná apresentaram organização cariotípica de $2n = 54$ cromossomos para machos e 55 cromossomos para fêmeas, um mecanismo de cromossomos sexuais múltiplos do tipo ZZ/ZW₁W₂; fórmula cromossômica 50 m/sm + 4 st para machos e 49 m/sm + 6 st em fêmeas. Os exemplares analisados do Rio Cuiabá possuem $2n = 54$ cromossomos e fórmula cariotípica de 42 m/sm + 2 st + 10 e, a localidade do Rio Paraguai possui $2n = 54$ cromossomos, sendo 36 m/sm + 2 st + 16 a. (Tabela 1).

No estudo de Moreira-Filho; Bertollo e Galetti (1984) com uma análise citogenética (Giemsa e bandamento C) na população de *A. affinis* do Rio Passa Cinco propuseram que o sistema de cromossomo sexual do tipo ZZ/ZW₁W₂ surgiu a partir de rearranjos estruturais e numéricos envolvendo o par metacêntrico nº 1 (Z), onde os cromossomos W₁W₂ tiveram sua origem aparentemente a partir da fissão cêntrica do primeiro par metacêntrico, seguido de uma inversão pericêntrica. Schemberger et al. (2011) reavaliaram a origem do sistema cromossomo múltiplo de *A. affinis* com o uso de pintura cromossômica e propuseram que a origem deste sistema foi a partir de translocação recíproca do par proto cromossomo sexual ZW com autossomo, seguido de fissão e inversão pericêntrica para a origem dos cromossomos W₁W₂.

Por sua vez, as amostragens do Alto Rio Paraguai (localidades dos Rios Cuiabá e Paraguai) não mostraram evidências na ocorrência de heteromorfismo de

cromossomos sexuais. Entretanto, *A. affinis* do Rio Cuiabá tem uma organização cariotípica com 5 pares de cromossomos acrocêntricos e Rio Paraguai apresentou 8 pares acrocêntricos, característica só encontrada nesta espécie entre os Parodontidae (Tabela 1). Schemberger et al. (2011) utilizando uma análise cariotípica ancorada no grupo externo Anostomidae propuseram que o cariótipo basal de Parodontidae seria organizado em 54 cromossomos m/sm. Desta forma, é provável que os cromossomos acrocêntricos encontrados para as populações dos rios da bacia do Rio Paraguai apresentem uma condição derivada para Parodontidae, com origem a partir de inversões pericentroméricas de cromossomos m/sm, o que pode ser corroborado pela manutenção do $2n = 54$ e variação do NF (de 108 para 98). Esta hipótese é reforçada pelos estudos de Moreira-Filho et al. (1984) que evidenciaram a partir de regiões organizadoras de nucléolo que os cromossomos acrocêntricos são derivados de cromossomos meta/submetacêntricos em *Apareiodon*.

Apareiodon affinis da região do Baixo Rio Paraná (Argentina) também não apresentou heteromorfismo de cromossomos sexuais, entretanto, um polimorfismo de fórmula cariotípica devido à presença de cromossomos acrocêntricos permitiu o estabelecimento de 10 citótipos (JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000). Neste estudo, para cada uma das diferentes localidades ao longo do Baixo Rio Paraná amostradas foram observados espécimes com $2n = 54$ cromossomos, porém com número de meta/submetacêntricos (48-50), subtelocêntricos (0-4) e acrocêntricos (0-6) variáveis, com conseqüentemente alteração do número fundamental (Tabela 1).

A ocorrência de características cromossômicas semelhantes entre *A. affinis* das populações do Rio Cuiabá e Baixo Paraná (Argentina) pode ser reflexo do fluxo gênico entre bacia do Rio Paraguai com o Baixo Rio Paraná (JESUS; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 1999; JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000). Para Jorge e Moreira-Filho (2000) é provável que os cromossomos acrocêntricos dos indivíduos de Cuiabá representem uma condição derivada dos organismos encontrados em Corrientes – Argentina (Tabela 1).

Em outra hipótese, a ocorrência deste polimorfismo de fórmulas cariotípicas para as populações do Baixo Rio Paraná pode ser explicada pela eliminação da barreira de Sete Quedas (divisor natural do Alto e Baixo Rio Paraná) inundada pela barragem de Itaipu em 1982. Nesta via, espécimes de *A. affinis* do Alto Rio Paraná poderiam descer a barragem de Itaipu e cruzar com exemplares do Baixo Rio Paraná. Nesta segunda hipótese, a especiação entre populações do Alto e Baixo Rio

Paraná como reflexo do isolamento geográfico da Sete Quedas ainda não seria completo. Entretanto, dados de sequenciamento do gene citocromo oxidase I revelou divergência genética de 0,3% entre as populações do Rio Paraguai e Rio Uruguai (continuação do Baixo Rio Paraná), e uma divergência genética de 6,1% foi descrita em relação destas populações com a população do Alto Rio Paraná, indicando especiação e ausência de fluxo gênico.

A utilização dos marcadores cromossômicos de rDNA nas diferentes populações de *A. affinis* demonstrou a localização conservada para o sítio de rDNA 18S em cromossomo subtelocêntrico, situação também observada nas demais espécies de *Apareiodon* (BELLAFRONTTE et al., 2009), ao contrário do gênero *Parodon*, que demonstra espécies com sítios de rDNA 18S em posições variáveis. O rDNA 5S, até o presente momento, só havia sido detectado em um provável par homeólogo entre as espécies de Parodontidae, com localização intersticial do braço curto de um par metacêntrico. Essa condição é compartilhada pelas populações de *A. affinis* do Alto Rio Paraná; entretanto, a população do Rio Cuiabá, Cuiabá - MT apresenta este par heteromórfico, sendo um cromossomo metacêntrico e outro acrocêntrico, enquanto a população do rio Paraguai apresentou o rDNA 5S no braço longo de um par acrocêntrico. Essa situação pode ser explicada por inversões pericêntricas e o aumento do número de acrocêntricos para as populações do Rio Paraguai.

As sequências de DNA satélite exercem um papel importante na evolução cariotípica, pois estão envolvidos com rearranjos cromossômicos, promovem movimentos intragênicos entre cromossomos não homólogos e entre diferentes domínios cromossômicos (WICHMAN et al., 1991; SLAMOVITS et al., 2001; VICARI et al., 2008). O DNA satélite pPh2004 de Parodontidae apresentou pequena variação entre as populações do Alto Rio Paraná, com aumento do número de sítios para a população do Lago de Itaipu, trecho final do sistema. Com relação às duas populações do alto Rio Paraguai, foi visualizado um aumento do número de sítios, essencialmente em cromossomos acrocêntricos, os quais poderiam estar auxiliando nos rearranjos de inversões pericêntricas e diferenciação cariotípica.

A citogenética tem auxiliado na taxonomia e sistemática de espécies de Parodontidae (CENTOFANTE; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2002; BELLAFRONTTE; MARGARIDO; MOREIRA-FILHO, 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). A análise cromossômica entre as localidades do Alto Rio Paraná e Rio Paraguai mostram divergências citogenéticas decorrentes do isolamento geográfico,

corroborando estudos moleculares que demonstram divergência evolutiva consistente com ausência de fluxo gênico e espécies diferentes (BELLAFRONTÉ et al., 2013). Desconsiderando a formação de híbridos entre exemplares do Rio Paraguai/Baixo Rio Paraná e Alto Rio Paraná a taxa *A. affinis* poderia ser considerado um complexo de espécies. *Apareidon affinis* tem sua localidade tipo descrita para região do Rio da Prata, Argentina, Steindachner, 1879. Assim, levando em consideração que as divergências cromossômicas entre Alto Rio Paraná e Rio Paraguai são consistentes com espécies distintas, *A. affinis* do Alto Rio Paraná deveria ter sua condição taxonômica revista.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (MMA/IBAMA/SISBIO) pela licença de captura de peixes na natureza. Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências

As referências bibliográficas encontram-se no final dessa dissertação

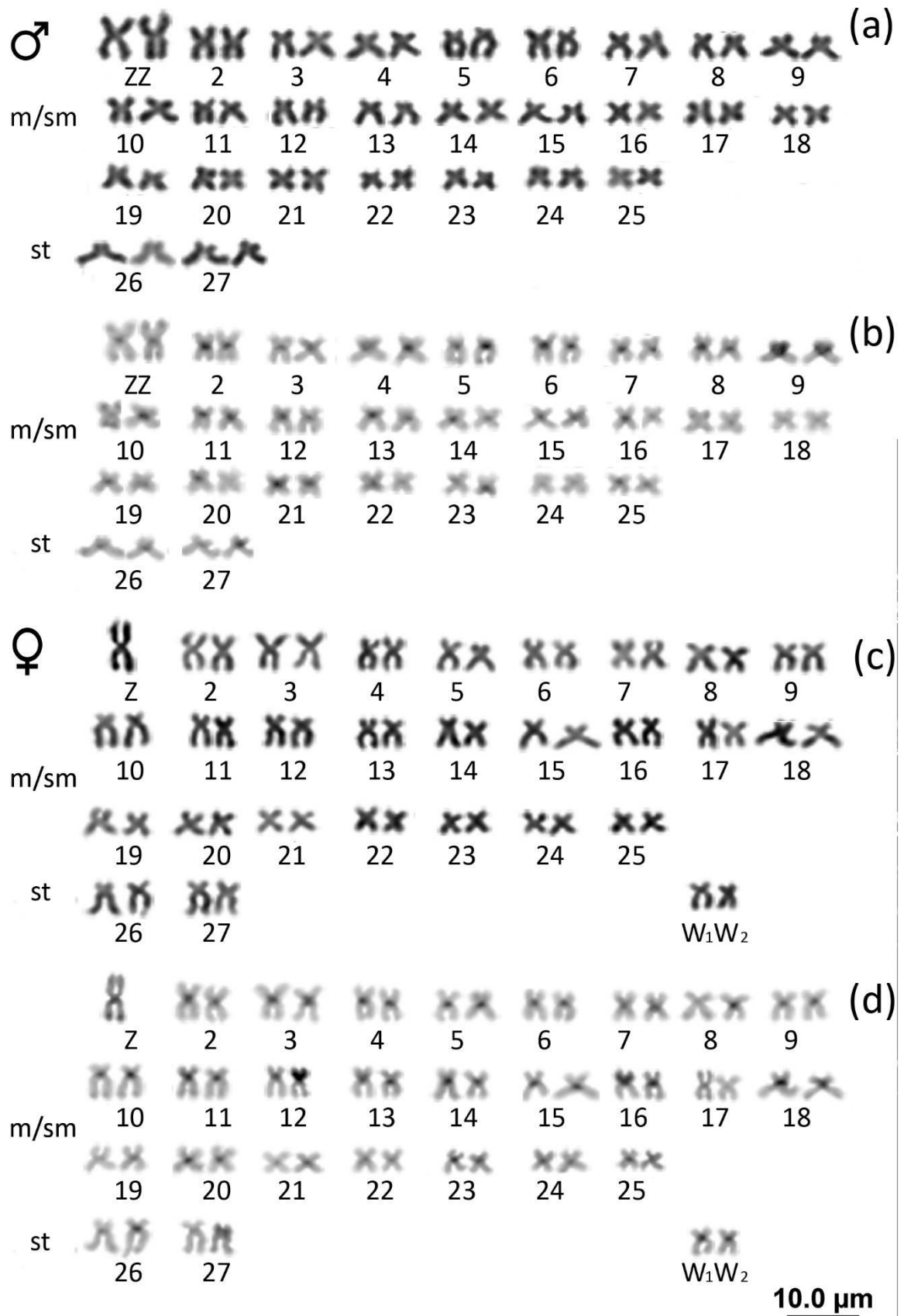


Figura 10. Cariótipos de *Apareiodon affinis* do rio Passa Cinco - SP em coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 μm.

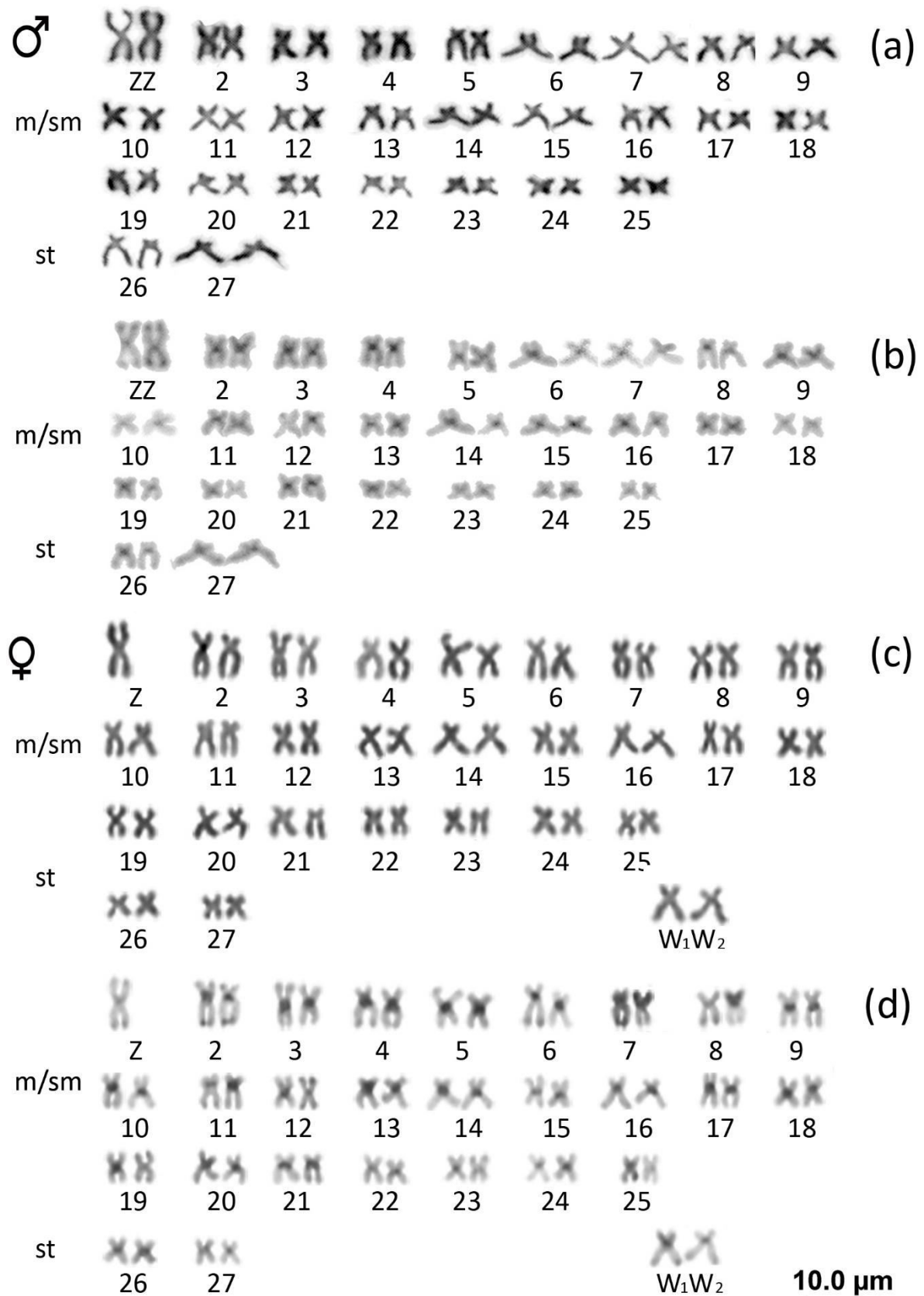


Figura 11. Cariótipos de *Apareiodon affinis* do rio Piracicaba - SP em coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 μm.

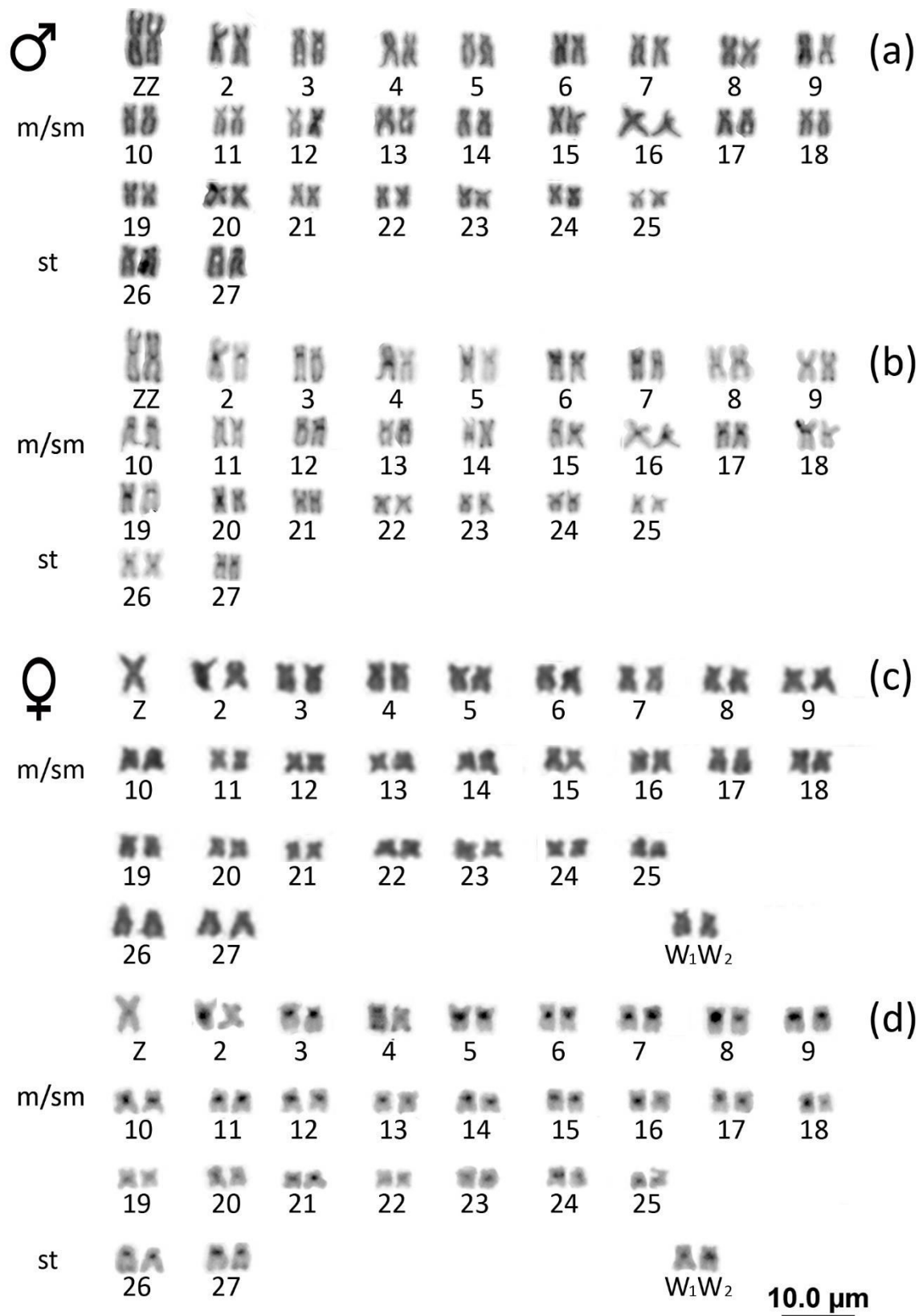


Figura 12. Cariótipos de *Apareiodon affinis* do rio Paraná – PR, localidade de Santa Helena-PR; coloração convencional por Giemsa (a e c) e bandamento C (b e d), sendo a e b (macho) e, c e d (fêmea). Barra = 10 μm.

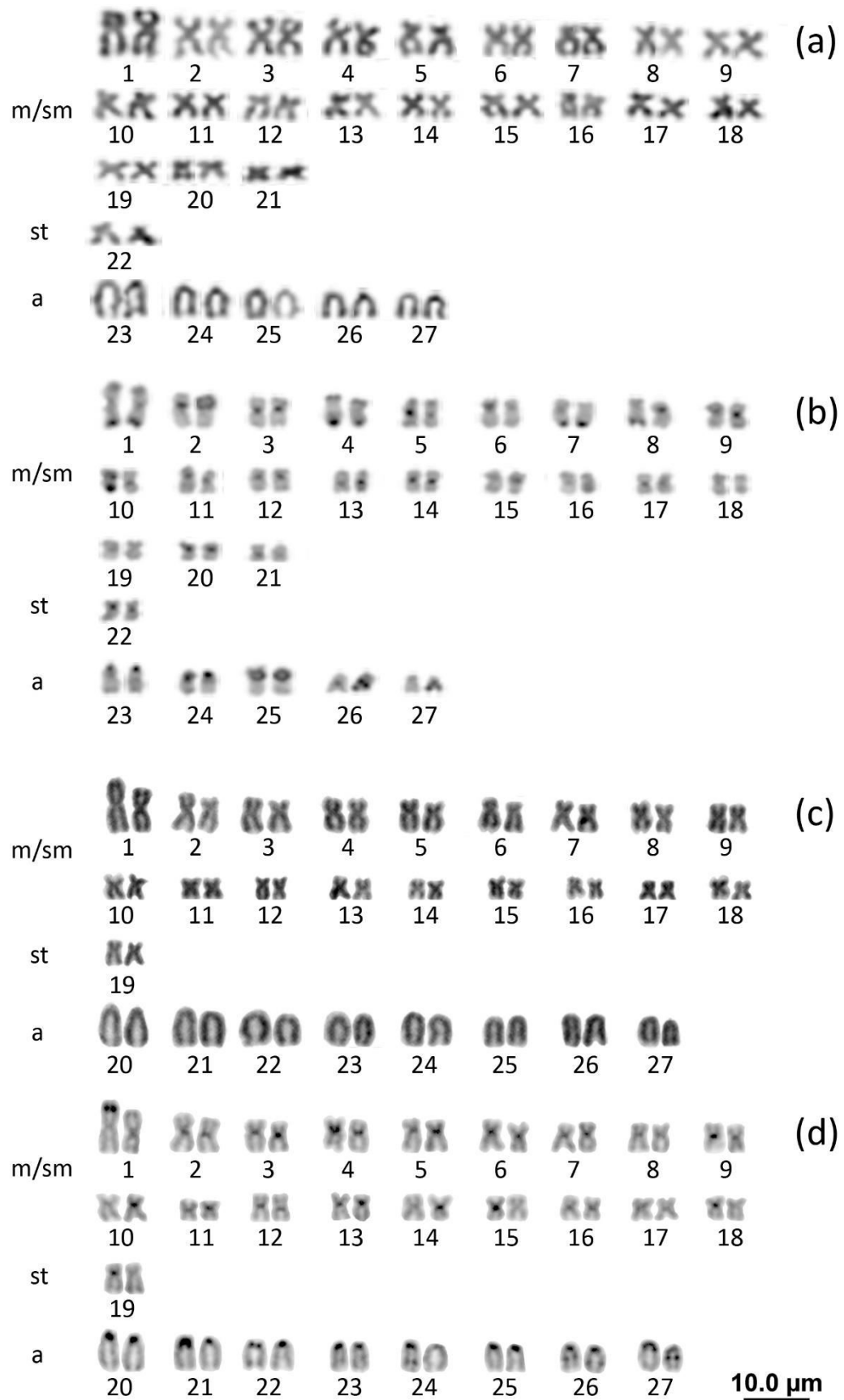


Figura 13. Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon affinis* do rio Cuiabá – MT (a, b) e rio Paraguai - MT (c, d); coloração convencional por Giemsa (a e c) e, bandamento C (b e d). Barra = 10 µm.

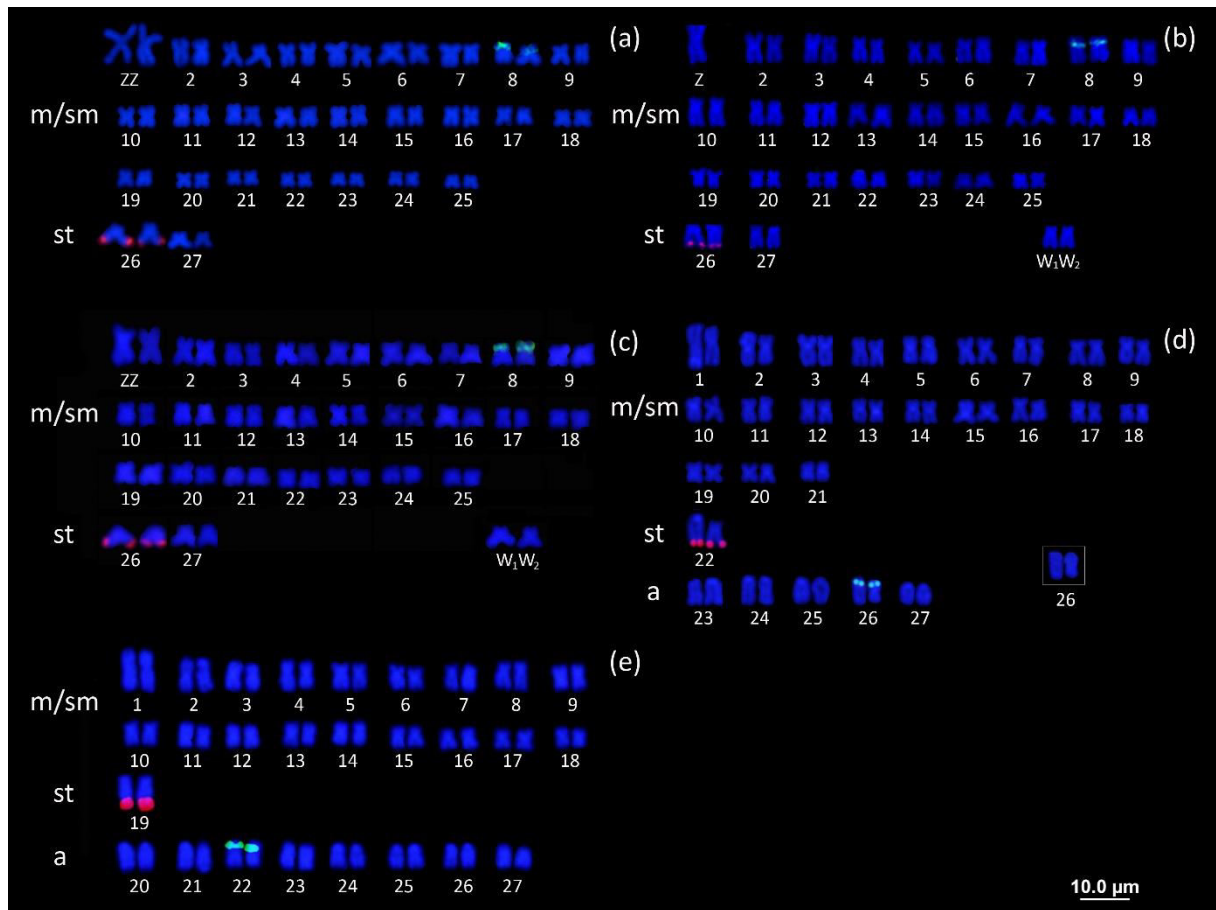


Figura 14. Cariótipos de *Apareiodon affinis* submetidos à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde). Em (a) Rio Passa Cinco, (b) Rio Piracicaba, (c) Rio Paraná, (d) Rio Cuiabá e, (e) Rio Paraguai. Barra = 10 μm.

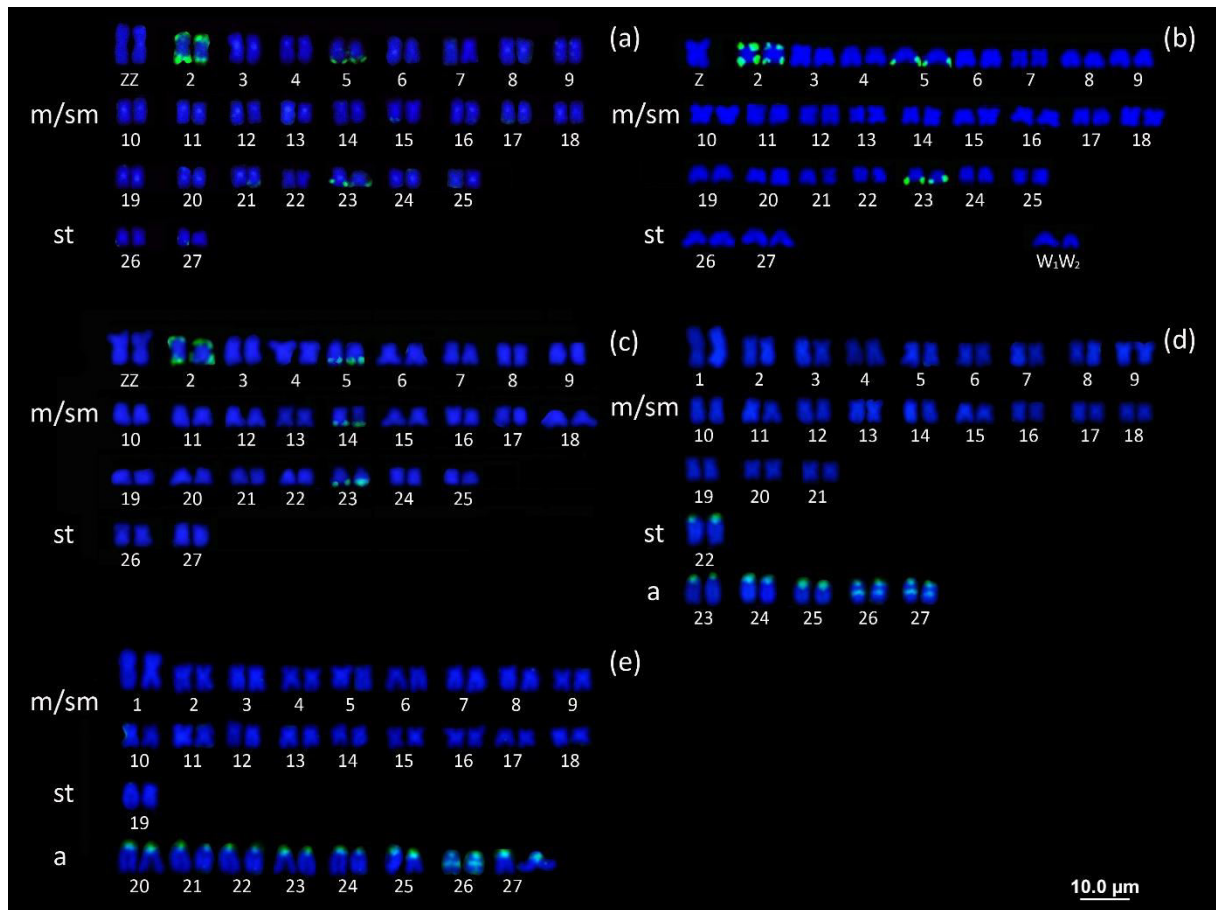


Figura 15. Cariótipos de *Apareiodon affinis* submetidos à FISH com sonda do DNA satélite pPh2004 (verde). Em (a) Rio Passa Cinco, (b) Rio Piracicaba, (c) Rio Paraná, (d) Rio Cuiabá e, (e) Rio Paraguai. Barra = 10 μm.

Tabela 1. Dados cariotípicos para cinco populações de *Apareiodon affinis*, três pertencentes ao sistema Alto Rio Paraná e duas do Alto Rio Paraguai.

Rio/ Localidade	Bacia Hidrográfica	Organização cariotípica	Cromossomos sexuais	Fórmula cariotípica	Banda C	rDNAs	DNA satélite pPh2004
Passa Cinco/ Ipeúna - SP	Alto Paraná	2n = 54 (♂) 2n = 55 (♀)	ZZ/ZW ₁ W ₂	50 m/sm+4 st (♂) 49 m/sm+6 st (♀)	Z, W1, W2	18S par 26 (st) 5S par 8 (m)	2, 5, 23, (st)
Piracicaba / Piracicaba - SP	Alto Paraná	2n = 54 (♂) 2n = 55 (♀)	ZZ/ZW ₁ W ₂	50 m/sm+4 st (♂) 49 m/sm+6 st (♀)	2, 7, Z, W1, W2	18S par 26 (st) 5S par 8 (m)	2, 5, 23, (st)
Paraná / Santa Helena - PR	Alto Paraná	2n = 54 (♂) 2n = 55 (♀)	ZZ/ZW ₁ W ₂	50 m/sm+4 st (♂) 49 m/sm+6 st (♀)	2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 27, Z, W1, W2	18S par 26 (st) 5S par 8 (m)	2, 5, 14, 23, (st)
Cuiabá / Cuiabá - MT	Alto Paraguai	2n = 54 (♂) 2n = 54 (♀)	Sem heteromorfismo	42m/sm+2 st+10 a	1, 4, 7, 8, 9, 10	18S par 22 (st) 5S par 26 (m/a)	22 (st), 23, 24, 25, 26,27 (a)
Paraguai / Cáceres - MT	Alto Paraguai	2n = 54 (♂) 2n = 54 (♀)	Sem heteromorfismo	36m/sm+2 st+16 a	5, 22, 23, 24, 26, 27	18S par 19 (st) 5S par 22 (a)	20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,27 (a)

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foram analisadas citogeneticamente cinco populações de *Apareidon affinis*: Rio Passa Cinco, Ipeúna–SP; Rio Piracicaba, Piracicaba–SP; Rio Paraná (lago da represa de Itaipu – Santa Helena–PR) pertencentes ao sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná e; Rio Cuiabá, Cuiabá–MT, e Rio Paraguai, Cáceres – MT, bacia do Rio Paraguai. As três amostragens analisadas do sistema do Alto Rio Paraná mostraram uma alta conservação cariotípica, com manutenção da fórmula cariotípica, sistema de cromossomos sexuais múltiplos, localização dos rDNAs 18S e 5S à exceção do DNA satélite pPh2004, que mostrou a ocorrência de um par com sítio adicional para a população do Rio Paraná (Lago da Represa de Itaipu).

As populações da bacia do rio Paraguai mostraram maior diferenciação entre si, com $2n = 54$ cromossomos sem heteromorfismo de cromossomos sexuais, no entanto, com diferenças nas fórmulas cariotípicas devido à variação do número de acrocêntricos; localização do rDNA 5S e, no número de sítios do DNA satélite pPh2004.

O $2n = 54$ cromossomos, todos m/sm, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais são características consideradas ancestrais em Parodontidae. As variações de fórmula cariotípica para as populações do Rio Paraguai são decorrentes do aumento do número de acrocêntricos, sem variação de $2n$, o qual é consistente com rearranjos do tipo inversão pericêntrica. Há uma provável participação do DNA satélite pPh2004 na origem das inversões pericêntricas para as populações da bacia do Rio Paraguai.

Quando comparadas as populações do Alto Rio Paraná às populações do Rio Paraguai, os marcadores cromossômicos demonstram forte evidência de divergência evolutiva com ocorrência de espécies distintas em isolamento geográfico. Estes resultados são corroborados por análises moleculares que também indicam espécies distintas entre Alto Rio Paraná e sistema Baixo Rio Paraná/ Plata/Uruguai/Paraguai. Nesta situação, a população de *A. affinis* do Alto Rio Paraná deveria ter sua condição taxonômica revista.

5. REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. Molecular research and control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 437-454, 2005.

AB'SABER, A.N. **Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação**. São Paulo: USP, 1997. p. 20.

AGOSTINHO, A. A.; MENDES, V. P.; SUZUKI, H. I.; CANZI, C. Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v.1, n.15, p. 175-189, 1993.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO, H.F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: **Estudos ecológicos de comunidade de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 374-400. p. 534.

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 – TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; DANIEL, M. F. Z.; TOLEDO-FILHO, S. A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**, v. 109, p.197-200, 2000a.

ALMEIDA- TOLEDO, L.F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z.; LOPES, C. E.; TOLEDO-FILHO, S. A. Sex chromosome evolution in fish II. Second occurrence of na X₁X₂Y Sex Chromosome System in Gymnotiformes. **Chromosome Research**, v.8, p. 335-340, 2000b.

ALHO, C. J. R. **Conservação da biodiversidade da Bacia do Alto Paraguai**. 1. ed. Campo Grande: UNIDERP, 2003. 449 p.

AMEMIYA, T.; GOLD, J.R. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. **Copeia**, v.1, p. 226-231, 1986.

ANDRADE, C.G.T.; JORDÃO, B.Q. O núcleo da célula. In JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.141-169.

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

ARTONI, R.F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; de JESUS, C. M.; de ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, p. 277-284, 2006.

AZEVEDO, M.F.C.; OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; WASKO, A. P.; FORESTI, F. Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). **Genetica**, v. 125, p. 205-210, 2005.

BELLAFRONTE, E. S.; 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, 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.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; MARGARIDO, V. P. Cytogenetic identification of invasive fish species following connections between hydrographic basins. **Hydrobiologia**, v.649, p. 347-354, 2010.

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. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 21, 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, 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.

BERTOLLO, L.A.C.; FONTES, M.S.; FENOCCHIO, A.S.; CANO, J. The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. GC- and chromosome replication banding. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499, 1997.

BERTOLLO, L.A.C.; MESTRINER, C.A. The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analysis. **Chromosome Research**, v.6, p. 141-147, 1998.

BERTOLETTI, J.J.; LUCENA, C.A.S., LUCENA, Z.M.S., MALABARBA, L.R. & REIS, R.E. Ictiofauna do rio Uruguai superior entre os municípios de Aratiba e Esmeralda, Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências PUC-RS**, v. 32, n. 48, p. 3-42, 1989.

BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acid Research**, v. 27, p. 596-600, 1999.

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.p.793.

BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. Na XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, v. 8, p. 111-118, 2000.

BÖHLKE, J.E.; WEITZMANN, S.H.; MENEZES, N.A. Estado atual da sistemática dos peixes de água-doce da América do Sul. **Acta Amazônica**, v.8, n. 4, p. 657-677, 1978.

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

BUCKUP, P.A. Relationship of Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L.R. et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 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. (Catálogo).

BRASIL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Bacia do Rio Paraná**. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/area.cfm?id_area=110>. Acesso em: 17 jun. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**, 3.ed. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/visualizar_texto.cfm?idtxt=1689>. Acesso em: 17 jun. 2013

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007; 91p; 227p.

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

CAROLSFIELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory Fishes of South America**. 1. Ed. USA: World Fisheries Trust, 2003. 380 p.

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.

CHARLESWORTH, B.; SNEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

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

CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus Caprini, Bovidae) of X – chromosome's constitutive heterochromatin by in situ restriction endonuclease digestion: X – chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**, v.121, p. 315-325, 2004.

CLARK, M.S.; WALL, W.A. **Chromosomes: The Complex Code**. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1996. 346p.

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.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguai Rivers: evolution and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v.1, p. 108-112, 1992.

CESTARI, M.M.; **Estudos citogenéticos bioquímicos em peixes do gênero Serrasalmus (Characiformes)**. 1996, 232 p. Tese – Universidade Estadual de São Carlos, São Carlos, 1996.

COLEMAN, A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, v. 19, n.7, p. 370-375, 2003.

COPATTI, C.E.; ZANINI, L.G.; VALENTE, A. Ictiofauna da microbacia do Rio Jaguari, Juaguari/RS, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n.2, p. 179-186, 2009.

DEININGER, P.L.; MORAN, J.V.; BATZER, M.A; KAZAZIAN Jr., H.H. Mobile elements and mammalian genome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, p. 651-658, 2003.

DOOLITTLE, W.E.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 601- 603, 1980.

EPPLEN, J.T.; KYAS, A.; MAULER, W. Genomic simple repetitive DNA are targets for differential binding of nuclear proteins. **Febs Letters**, v.389, p. 92 -95, 1996.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 06 ago. 2013

FELDBERG, E.; PORTO, J.I.; BERTOLLO, L.A. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) on the Amazon region. **Genetics**, v. 15, p. 369-383, 1992.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O; SANTOS, A.F. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome*, v. 29, p. 1-4, 1987.

FERREIRA, D.C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding fish genome. **Mobile Genet Elements**, v. 1, p. 1-6, 2011.

FESCHOTTE, C. Merlin, a New Superfamily of DNA transposons identified in Diverse Animal Genomes and Related to Bacterial IS1016 Insertion Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 9, p. 1769-1780, 2004.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368, 2007.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p. 397-405, 2008.

FUJIWARA, A. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 463-471, 1998.

GALLETI Jr., P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus*, *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 4, p. 11-15, 1981.

GALLETI Jr, P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolus organizer regions. **Caryologia**, v. 37, p. 401-406, 1984.

GALETTI Jr., P.M.; SILVA, E.B.; CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.8, p. 479-484, 1985.

GALLETI Jr, P.M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 43, p. 43-46, 1986.

GALETTI Jr, 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.

GARCIA-PARRA, W.J. **Citogenética Comparativa de Peixes da Subfamília Myleinae (Serrasalminae, Characiformes) da Amazônia Central**. 2000, 156 p. Tese – INPA, Amazônia, 2000.

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

GÉRY, J. 1969. Biogeography and Ecology in South America. In: REIS, R.E. et al. **Check list of the freshwater of South and Central America**. 1ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 828-848 p. 742 p.

HAAF, T.; SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; GALETTI Jr., P.M.; WILLARD, H.F. Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chromosome Research**, v. 1, p. 77-86, 1993.

HAHN, N.S.; PAVANELLI, C.S; OKADA, E.K. Dental development and ontogenetic diet shifts of *Roebooides paranensis* Pignatelli (Osteichthyes, Characinae) in pools of

the Upper rio Paraná floodplain (state of Paraná, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 1, p. 93-99, 2000.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr, 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.

HERPIN, A.; BRAASCH, I.; KRAEUSSLING, M.; SCHMIDT, C; THOMA, EC; NAKAMURA, S; TANAKA, M.; SCHAT, M. Transcriptional Rewiring of the Sex Determining dmrt1 Gene Duplicate by Transposable Elements. **Plos Genetics**, v. 6, n. 2, p. 1-15, fev. 2010.

HIZUME, M. Allodiploid nature of *Allium wakegi* Araki revealed by genomic *in situ* hybridization and localization of 5S and 18S rDNAs. **Jpn. J. Genet.** v. 69, n.23, p. 407-415, 1994

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

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

INGENITO, L.F.S. **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes)**.2008,127f.Tese de doutorado. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

INGENITO, L.F.S.; BUCKUP, P.A. A new species of Parodon from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia**, v. 2005, n.4, p. 765-771, 2005.

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, p.75-80, 2000b.

JESUS, C.M.; GALETTI Jr., P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v.118, p. 25-32, 2003.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-74, 1985.

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

JOHN, S.; WORKMAN, J. Bookmarking genes for activation in condensed mitotic chromosomes. **BioEssays**, v.20, n. 4, p. 275-279, abr. 1998.

KANTEK, D. L.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L.A.; MOREIRA-FILHO, O.M. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. (Characiformes: Characidae) from the upper Iguazu River (PR). **Folia Biologica**, v. 57, p.37-41, 2009.

KAWATAKE, H.S. **Variação espacial na dinâmica das populações do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* – Agassiz, 1829) na Bacia do Alto Paraguai**. 2006, 41 p. Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso, Campo Grande, 2006.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA**: v. 94, p. 7704-7711, 1997.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genética**, v. 115, p. 49-63, 2002.

LANGEANI, F. **Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1988, com a descrição de quatro novas espécies do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae)**. Commun. 1.ed. Porto Alegre: PUCRS, 1990. 3-31p. 188 p.

LANGEANI, F.; SERRA, J.P.; CARVALHO, F.R.; CHAVES, E.F.; FERREIRA, C.P. MARTINS, F.O. Fish, *Hasemania 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.

LEE, M.R.; ELDER, FFB. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 26, p. 36-40, 1980.

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

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.

LIMA, W.P. **Hidrologia Florestal Aplicada ao Manejo de Bacias Hidrográficas**. 2008. Disponível em: <<http://www.ipef.br/hidrologia/hidrologia.pdf>> Acesso em: 10 jul.2013.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2453-2465, 2002.

LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, p. 317-324, 2001.

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

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

LUNDBERG, J.G. African-South American freshwater fish clades and continental drift, problems with a paradigm. In: _____. **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven: P. Goldblatt, 1993. p.156 -199.

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. p. 603.

LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v. 36, p. 762-773, 1993.

MARIÑO-RAMÍREZ, L.; JORDAN, L.K.; LANDSMAN, D. Multiple independent evolutionary solutions to core histone gene regulation. **Genome Biology**, v.7, n. 12, p. 115-122, 2006.

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

MARTINS, C.; GALETTI JR, P.M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**, v. 8, p. 353-355, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI JR. PM. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? **Genetica**, v. 111, n. 3, p. 439-446, 2001.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5s ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C.R. **Focus on Genome Research**. 1. ed. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2004. p. 335-363.

MARTINS, C.; FERREIRA, I.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI Jr., P.M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, p. 133-141, 2006.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E. et al. **Fish Cytogenetics**. 1 ed. USA: Science Publisher, 2007. p.421-453.

MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; de OLIVEIRA S.G. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. In: URBANO, K.V. **Advances in Genetics Research**. 4. ed. Hauppauge: Nova Science Publisher, 2011. p. 1-82.

MARTÍNEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.73, p. 149-152, 1996.

MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; AGATA, K.; MATSUDA, Y. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 48, p. 18190-18195, 2006.

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: Acad. Brasileira de Ciências, 1988. p.295-304. p.488.

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.

MESTRINER, C.A.; GALETTI Jr., P.M.; VALENTINI, S.R.; RUIZ, I.R.G.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Strutral and functional evidence that a b chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

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

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.123, p. 211-216, 2005.

MORÁN, P.; MARTINEZ, J.L.; GARCIA-VAZQUEZ, E.; PENDAS, A.M. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.75, p. 145-150, 1996.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, P. M. Evidences 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, P. M. Struture and variability of nucleolar organizer regions Parodontidae fish. **Cytologia**, v.26, p. 564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI JR, P.M. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). **Caryologia**, v.38, p. 45-55, 1985.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 331-357, 1991.

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

MULLER, H. J. Some genetic aspects of sex. **American Naturalist**, v. 66, p. 118–138, 1932.

MURAKAWI, M.; FUJITANI, H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). **Genes & Genetics System**, v. 73, p. 9-20, 1998.

MYERS, G.S. Fresh Water Fishes and West Indian Zoogeography Annual Report of the Smithsonian Institution for. In: BERRA, T.M. **Freshwater Fish Distribution**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 2001. 339-364.

NAEGELE, M.P.; da COSTA, P.I.; da ROSA, J.A. Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 353-357, 2006.

NAKAYAMA, C.M.; JÉGU, M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; MCEACHRAN, J. D. Karyological evidence for a cryptic species of Piranhas within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, v.3, p. 866-869, 2001.

NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 114, p. 231-236, 2002.

NAKAYAMA, C.M. **Citogenética molecular comparativa do DNAr 18 S e 5 S em piranhas (Serrasalminae, Characidae) da Amazônia central**. 2007, p. 180. Tese. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2007.

NANDA, I.; ZEND-AJUSCH, E.; SHAN, Z.; GRÜTZNER, F.; SCHARTL, M.; BURT, D.W.; KOEHLER, M.; FOWLER, V.M.; GOODWIN, G.; SCHNEIDER, W.J.; MIZUNO, S.; DECHANT, G.; HAAF, T.; SCHMID, M. Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re) view on avian sex determination. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.89, p. 67-78, 2000.

NEI, M. Linkage modification and sex difference in recombination. **Genetics**, v.63, p. 681 – 699, 1969.

NELSON, J.P. **Fishes oh the World** . 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 2006. p.148-151.

NOWAK, R. Mining treasures from 'junk DNA'. **Science**, n. 263, v. 5147, p. 608-610, 1994.

OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; dos ANJOS, M.B., ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, n.2, p. 243-249, 2008.

ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**, n. 284, v. 5759, p. 645-646, 1980.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **System Biology**, v.46, n.1,p. 75-100, 1997.

PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA. **Bacias Hidrográficas do Paraná – Série Histórica**. 1 ed. Curitiba: Via Comunicação Integrada, 2010. 7p.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 3, p.218-223, 2007.

PAVANELLI, C.S.; BRITSKI, H.A. Description of new species of *Steindacherina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyology**, v.10, p. 211-216, 1999.

PAVANELLI, C.S. Family Parodontidae. In REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **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. Família Parodontidae In: BUCKUP, A. B.; 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.

PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.36, p. 307-314, 1983.

PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VASQUES, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in Brown trout. **Chromosome Research**, v. 1, p. 63-67, 1993.

PENDÁS, A.M.; MORAN, P.; FREIJE, J.P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 31-36, 1994.

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

PHILLIPS, R.B.; IHSEN, P.E. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 39, p. 14-18, 1985.

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Molecular Biology Evolution**, v. 19, n. 8, p. 1329-1340, 2002.

PONS, J.; GILLESPIE, R.G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v.313, p. 169-177, 2003.

PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M.; FALCÃO, J.N. A checklist of chromosome number and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Revista de Hidrobiologia Tropical**, v.25, n. 4, p. 287-299, 1992.

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.

PLOHL, M.A.; LUCHETTI, A. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v.409, n.1-2, p. 72-82, 2008.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; PANSONATO-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.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2. ed. Âmbito Cultural, 1997. 747p.

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, 1974.

ROSA, S.R.; LIMA, F.C. **Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção**. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_publicacao/147_publicacao31032009031646.pdf. Acesso em: 16 ago. 2013.

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.

REIS, R.E; KULLANDER, S.O; FERRARIS, J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003. 729 p.

SAJDAK, S.L.; REED, K.M.; PHILLIPS, R.B. Intrainvidual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 680-688, 1998.

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 f. Tese (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.

SCHEMBERGER, M.O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; SCHÜHLI, 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.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, M.C.; ROSA, S.P.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA₃/DA/DAPI staining. **Genetica**, v. 28, p. 333-346, 2006.

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

SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v. 95, p. 271-284, 1987.

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 tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A phylogenetic approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 9, p. 1708-1719, 2001.

SMITH, S.G.; VIRKK, N. Coleoptera. In: **Animal cytogenetics**. Berlin: B. John, 1978. p. 59-70. 1978.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome. Evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 49, p. 134-143, 2005.

SILVA, E.B.; MARGARIDO, V.P. An X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). **Environmental Biology of Fishes**, v. 73, p. 293-297, 2005.

SILVA, M.; MATOSO, D.A.; VICARI, M.R.; de ALMEIDA, M.C.; MARGARIDO, 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.

SOUZA, F.E.E. **Aspectos da geologia e estratigrafia dos depósitos sedimentares do Rio Paraná entre Porto Primavera (MS) e Guaira (PR)**. 1993, 214f. Tese – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 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**. 1ed. Malden: Blackwell Science Ltd, 2003. p. 275.

SUMNER, E.M.; RADCLIFFE, D.E.; MCCRAY, M.; CARTER, E.; CLARK, R.L. Gypsum as an ameliorant for subsoil hardpans. **Soil Technology**, v. 3, p. 253-258, 1990.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 72, p. 1-4, 1996.

TEIXEIRA, W.G.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; PINHAL, D.; POLETTO, A.B.; VENERE, P.C.; MARTINS, C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 224-234, 2009.

TIMBERLAKE, W.E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v. 202, n. 5, p. 973-975. 1978.

TRAVASSOS, H. Ictiofauna de Pirassununga. I- Subfamilia Parodontidae Eigenmann, 1916 (Actinopterygii-Cypriniformes). **Boletim do Museu Nacional**, v.129, p.1-31, 1955.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profile – Causes and effects. **EMBO Journal**, v. 21, p. 5955-5959, 2002.

VENERE, P.C.; GALETTI Jr, P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 12, n. 1, p. 17-25, 1989.

VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I.; BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal localization of 18 S + 28 S and 5 S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. **Chromosoma**, v. 84, p. 475-491, 1982.

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

VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, 29(4), 621-625, 2006b.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. **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.

VOLTOLIN, T.A.; SENHORINI, J.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. B – chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 138, p. 281-284, 2010.

VOLFF, J.N.; BOUNEAU, L.; OZOUF-COSTAZ, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetics**, v.19, n.12, p. 674-678, 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.

WALSH, J.B. **Genome Evolution: Overview**. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001810/full>> . Acesso em: 16 maio. 2013.

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.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American journal of human genetics**, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

WHITE, M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. 3. ed. Nova York: Cambridge University Press, 1973. 933 p.

WICHMAN, H.A.; PAYNE, C.T.; RYDER, O.A.; HAMILTON, M.J.; MALTBIIE, 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.

WWF. The Nature Conservancy. **Análise de Risco Ecológico da Bacia do Rio Paraguai: Argentina, Bolívia, Brasil**. 1. ed. 2012. 54 p. Disponível em: <http://d3nehc6yl9qzo4.cloudfront.net/downloads/26jan12_tnc_wwf_analise_de_risco_portugues.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2013.

YUNIS, J.J.; YASMINEH, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Strutural DNA of eucaryotes may support and protect genes and in speciation. **Science**, v. 174, p. 1200-1209, 1971.

6. ANEXOS

Anexo 01 – 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 NAO 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 NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

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 02 – 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

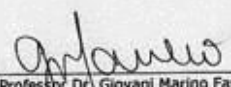
Prezado Professor,

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 PROPEP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 03 – Marcação da sonda sondas de DNAr por *Nick Translation*

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

Anexo 04 – Marcação da sonda sondas de DNAr 5S por PCR

A sonda de rDNA 5S foi marcada por meio do método PCR, usando biotina-16-dUTP (Roche®). O PCR marcado com *primers* específicos foi realizado para o rDNA usando 20 ng de molde de DNA, 1X *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM de dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM biotina-16-dUTP, 1 µM de *primers*, 2mM MgCl₂ e 0.05 U/µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).