



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Investigação do papel dos DNAs repetitivos na evolução cromossômica de espécies de *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae).

Josiane Baccarin Traldi

São Carlos

2015

**Investigação do papel dos DNAs repetitivos na evolução cromossômica de
espécies de *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae).**

São Carlos

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA
E BIOLOGIA MOLECULAR

Investigação do papel dos DNAs repetitivos na evolução cromossômica de espécies de *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae).

Josiane Baccarin Traldi

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética e Evolução, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T769ip Traldi, Josiane Baccharin
Investigação do papel dos DNAs repetitivos na
evolução cromossômica de espécies de Apareiodon
(Characiformes, Parodontidae) / Josiane Baccharin
Traldi. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Citogenética de peixes. 2. Genética. 3. COI.
4. Hibridização in situ fluorescente. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Josiane Baccarin Traldi, realizada em 27/11/2015:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
UEPG

Profa. Dra. Michelle Orane Schemberger
UEPG

Prof. Dr. Roberto Landondo Lui
Unioeste

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Unioeste

Dedico este trabalho aos meus pais

Nilce e Edson pelo amor, apoio

e confiança.

*“Procure ser um homem de valor, ao invés
de ser um homem de sucesso.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, em quem eu sempre mantive minha fé, por nunca me abandonar em momento algum.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, meu orientador, pelas oportunidades e confiança. Agradeço também pela amizade, paciência, excelente orientação e por todos os ensinamentos importantes.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela co-orientação, paciência, amizade, estando disposto a me ajudar em qualquer problema que surgisse, mesmo à distância.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira, pelo auxílio com os dados moleculares e sugestões para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pelas sugestões e colaborações para o trabalho, pela amizade e oportunidade de convívio.

À Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli, por sempre nos ajudar com a identificação taxonômica das espécies.

Aos Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo e Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, pela amizade e oportunidade de convívio.

Aos técnicos do laboratório Piau, Gallo e Toninho, por sempre auxiliarem imensamente dentro do laboratório e nos períodos de coleta.

À secretária da Pós-Graduação Ivanildes, que sempre me auxiliou em todos os processos da pós com muita paciência e dedicação.

Aos colegas de Botucatu, em especial a Cris e a Luz, que me receberam com muito carinho e me ajudaram em tudo que precisei.

Aos colegas de Ponta Grossa, em especial a Kaline, que sempre me ajudaram mesmo à distância.

Aos colegas da cito Cássia, Ezequiel, Taapu e Nuntiya, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração. Agradeço em especial à minha “orientada” Geovana por sempre escutar minhas lamentações e me ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas da molecular, que muito me auxiliaram na utilização de equipamentos e realização de algumas técnicas. Agradeço em especial ao Ueslei, por me ajudar em muitos problemas.

Aos amigos, ex-colegas de laboratório e eternos chefes Dani e Beto, que mesmo estando longe, nunca me abandonaram, me auxiliando sempre em tudo que eu precisasse.

À Ju, minha eterna parceira de bancada, que nunca me abandonou mesmo que uma grande distância nos separe agora, e sempre me apoiou em todos os momentos de dificuldade e desânimo.

À Má, minha fiel escudeira, pelo companheirismo e paciência nesses anos, sempre me ouvindo, me ajudando e tornando a minha pós-graduação mais divertida. As minhas amigas de longe, Mili, Mel, Pri, Le, Dani, Ma Brum e Gabi, que apesar da distância sempre estiveram presentes em minha vida.

À minha família, especialmente meus pais, Edson e Nilce, minhas irmãs, Vani e Bia, meu namorado, Gustavo, e minha avó, Marina, que sempre me encorajaram e me ajudaram em todos os momentos. Agradeço também à minha tia, Marta, e minha prima, Jé, por sempre se fazerem presentes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (processo N° 2012/15258-0) que muito auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio) pela autorização (licença N°10538-1) e apoio na coleta dos exemplares.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução e ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

DADOS CURRÍCULARES DA AUTORA

JOSIANE BACCARIN TRALDI – Nascida em 1 de Outubro de 1989, na cidade de Descalvado, SP, Brasil. Iniciou sua graduação na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, campus São Carlos no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, graduando-se em dezembro de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC em 2008 e 2009 e, posteriormente, bolsista FAPESP em 2009 e 2010. Defendeu o Mestrado em 2012 com a dissertação intitulada: “Citogenética comparativa em espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo” junto ao programa de Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, com menção de Louvor, sendo bolsista FAPESP. Em seguida ingressou no Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG), sendo bolsista FAPESP.

Durante esse período, participou de vários projetos de pesquisa coordenados por seu orientador e co-orientador. Apresenta 9 artigos publicados em periódicos da área e 1 aceito para publicação. Participou de 15 eventos científicos da área, nos quais apresentou 38 trabalhos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Resumo	v
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais da ordem Characiformes	1
1.2. Aspectos gerais da família Parodontidae	2
1.3. Estudos cromossômicos e DNA Barcode em Parodontidae	3
1.4. Estudos de DNAs repetitivos, com ênfase em peixes neotropicais	5
1.5. Bacia do Tocantins-Araguaia	7
1.6. Bacia do Jaguaribe	8
1.7. Referências	8
1. 8. Figuras e Tabelas	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Amostras coletadas	22
4.2. Caracterização dos locais de coleta	22
4.3. Metodologia Citogenética Clássica	23
4.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos	23
4.3.2. Bandamento C	26
4.3.3. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)	26
4.4. Metodologia Citogenética Molecular	26
4.4.1. Isolamento de DNAs repetitivos	26
4.4.2. Marcação das sondas	28
4.4.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	28
4.5. Forma de análise dos resultados citogenéticos	30
4.6. Metodologia Molecular	31
4.6.1. Extração de DNA	31
4.6.2. Amplificação do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI)	31
4.6.3. Sequenciamento do DNA	32
4.6.4. Análise dos dados	32
4.7. Referências	33

4.8. Figuras e Tabelas	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Capítulo 1	44
Resumo.....	45
Abstract	46
5.1.1. Introdução.....	47
5.1.2. Materiais e Métodos	48
5.1.3. Resultados	50
5.1.4. Discussão.....	51
5.1.5. Agradecimentos.....	56
5.1.6. Referências	57
5.1.7. Figuras e Tabelas.....	64
5.2. Capítulo 2	68
Resumo.....	69
Abstract	70
5.2.1. Introdução.....	71
5.2.2. Materiais e Métodos	72
5.2.3. Resultados	74
5.2.4. Discussão.....	76
5.2.5. Agradecimentos.....	80
5.2.6. Referências	80
5.2.7. Figuras e Tabelas.....	84
5.3. Capítulo 3	95
Resumo.....	96
Abstract	97
5.3.1. Introdução.....	98
5.3.2. Materiais e Métodos	99
5.3.3. Resultados	101
5.3.4. Discussão.....	101
5.3.5. Agradecimentos.....	104
5.3.6. Referências	104
5.3.7. Figuras e Tabelas.....	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

Lista de Figuras

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Fotos das espécies de Parodontidae coletadas, com suas respectivas medidas do comprimento padrão. Exemplar de *Apareiodon cavalcante*, 63mm (a); *Apareiodon* sp.1, 65mm (b); *Apareiodon* sp. 2, 62mm (c); *Apareiodon machrisi*, 72mm (d); *Apareiodon argenteus*, 90mm (e); *Parodon* cf. *pongoensis*, 67mm (f); *Apareiodon davisii*, 72mm (g).....37
- Figura 2.** Mapa do Brasil com os pontos de coleta das espécies da família Parodontidae. Imagens extraídas do Google Earth.....38
- Figura 3.** Local de coleta de *Apareiodon cavalcante* (rio Claro, Cavalcante - GO).....39
- Figura 4.** Local de coleta de *Apareiodon* sp. 1 (rio Passa-Treizinho, Uruaçu - GO).....40
- Figura 5.** Local de coleta de *Apareiodon* sp. 2 (rio Bandeirinha, Formosa - GO).....40
- Figura 6.** Local de coleta de *Apareiodon machrisi* (ribeirão Cristalino, Campinorte - GO).....41
- Figura 7.** Local de coleta de *Apareiodon argenteus* e *Parodon* cf. *pongoensis* (rio Araguaia, Aragarças - GO).....41
- Figura 8.** Local de coleta de *Apareiodon davisii* (rio Salgado, Icó - CE).....42

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1

- Figura 1.** Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (a) e *Apareiodon davisii* (c) corados com Giemsa. Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (b) e *Apareiodon davisii* (d) tratados pelo bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.64
- Figura 2.** Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (a) e *Apareiodon davisii* (c) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho). Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (b) e *Apareiodon davisii* (d) submetidos à hibridização *in situ*

fluorescente com sondas de sondas pPh2004 (sinal verde) e WAp (sinal vermelho). Em destaque, os cromossomos portadores de duas sondas.....65

Figura 3. Polimorfismo de *Apareiodon davisi*. Pares cromossômicos portadores de polimorfismo dos genes ribossomais 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho).....66

Capítulo 2

Figura 1. Figura representativa da área de coleta. Imagens extraídas do Google Earth.....84

Figura 2. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) com coloração convencional com Giemsa.....85

Figura 3. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) tratados com bandamento C. Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.....86

Figura 4. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho). Em destaque os cromossomos portadores de sítios das duas sequências.....87

Figura 5. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda telomérica (TTAGGG)_n.....88

Figura 6. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda (GATA)_n.....89

Figura 7. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNA

satélite pPh2004 (sinal verde) e fração repetitiva WAp (sinal vermelho). Em destaque os cromossomos portadores de sítios das duas sequências.....90

Figure 8. Árvore de Neighbour-Joining usando o modelo de distância Kimura-2-parâmetros. Números nos nós representam valores de bootstrap obtidos em 1000 pseudoréplicas. À direita, idiograma representativo dos pares cromossômicos marcadores e seus respectivos sítios das sondas utilizadas para as espécies analisadas.....92

Figura 9. Rede de haplótipos formada com as amostras de *Apareiodon cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *Apareiodon machrisi*. Os traços indicam passos mutacionais e o tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras correspondentes a cada haplótipo.....93

Capítulo 3

Figura 1. Ilustração da inserção do elemento transponível da sequência da histona H1.....109

Figura 2. Cariótipos das espécies de Parodontidae submetidas à FISH com sondas de histonas H1 (sinal verde) e H4 (sinal vermelho).....110

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Espécies válidas para a família Parodontidae.....	18
Tabela 2. Espécies da família Parodontidae encontradas em território brasileiro.....	19
Tabela 3. Espécies de <i>Parodon</i> e <i>Apareiodon</i> que apresentam estudos citogenéticos até o momento.....	19

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Espécies coletadas e informações dos pontos de coleta.....	36
---	----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 2

Tabela 1. Informações das espécies coletadas.....	84
Tabela 2. Distância Genética (média \pm erro padrão) entre as espécies analisadas. Na diagonal principal (negrito) estão os valores intraespecíficos.....	91

Capítulo 3

Tabela 1. Espécies coletadas e informações dos pontos de coleta.....	109
---	-----

Resumo

Parodontidae é composta pelos gêneros *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*, incluindo 32 espécies consideradas válidas. Destas, 16 ocorrem em território brasileiro e apenas 11 possuem dados cromossômicos disponíveis. Considerando a escassez de dados citogenéticos para espécies de Parodontidae das bacias dos rios Tocantins-Araguaia e Jaguaribe, o presente trabalho analisou através de metodologias citogenéticas (clássicas e moleculares) e moleculares (DNA Barcode) seis populações da bacia dos rios Tocantins-Araguaia (*Apareiodon cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *Apareiodon machrisi*, *Apareiodon argenteus* e *Parodon* cf. *pongoensis*) e uma espécie da bacia do rio Jaguaribe (*Apareiodon davisii*), com o intuito de contribuir para o conhecimento da diversidade genética da família e auxiliar na compreensão da taxonomia e evolução cromossômica desse grupo de peixes. Para todas as espécies de *Apareiodon* analisadas, foi identificada conservação no número diploide, padrão de distribuição de heterocromatina e padrão de dispersão da fração repetitiva WAp. Entretanto, a fórmula cariotípica, as regiões organizadoras de nucléolo ativas, a localização dos genes ribossomais 45S e 5S e a distribuição dos sítios do DNA satélite pPh2004 mostraram-se variáveis entre as espécies. As sequências (GATA)_n e telomérica (TTAGGG)_n exibiram padrão similar para *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi*. No presente trabalho foram descritos os primeiros relatos de co-localização de genes ribossomais para Parodontidae, sendo observados em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi* e *A. davisii*, e também do polimorfismo envolvendo as duas sequências ribossomais verificado em *A. davisii*. As análises da localização das sequências das histonas H1 e H4 representam os primeiros dados de genes histônicos para a família e evidenciaram para as sete espécies coletadas a ocorrência de co-localização destas sequências em um par cromossômico, ocorrendo um sítio adicional de H1 em *A. davisii*, e sítios dispersos dessa sequência pelos cromossomos das espécies. Análises cromossômicas e de DNA Barcode realizadas para *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi* evidenciaram divergência recente entre esses grupos de indivíduos,

sugerindo que *Apareiodon* sp. 2 represente uma possível espécie que carece de descrição taxonômica e *Apareiodon* sp. 1 seja uma população de *A. machrisi*. O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da diversidade genética de Parodontidae, apresentando dados cromossômicos e moleculares inéditos desta família. Análises gerais dos dados cromossômicos conhecidos para a família revelam conservação da macroestrutura cariotípica, entretanto, análises mais detalhadas evidenciam a ocorrência de uma grande diversidade cromossômica em nível microestrutural. Os resultados apresentados no presente trabalho, juntamente aos disponíveis em literatura, indicam que esta diversidade da microestrutura cromossômica encontra-se claramente associada à dinâmica dos DNAs repetitivos.

Palavras-chave: peixes, citogenética clássica, citogenética molecular, DNA Barcode, evolução cromossômica

Abstract

Parodontidae comprises the genera *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*, including 32 valid species. Of these, 16 occur in Brazil, and only ten defined at species level and one at genus level possess available chromosomal data. Due to the lack of cytogenetic data of Parodontidae species from the Tocantins-Araguaia and Jaguaribe river basins, this study analyzed by cytogenetic (classical and molecular) and molecular (DNA Barcode) methods six populations from the Tocantins-Araguaia river basin (*Apareiodon cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *Apareiodon machrisi*, *Apareiodon argenteus* and *Parodon* cf. *pongoensis*) and one species from the Jaguaribe river basin (*Apareiodon davisii*), in order to contribute to the knowledge of the genetic diversity of the family and assist in the understanding of chromosome evolution of this fish group. For all of the *Apareiodon* analyzed species was identified conservation in diploid number, distribution pattern of heterochromatic blocks and dispersion pattern of repetitive fraction WAp. However, karyotype formula, active nucleolar organizer regions, location of ribosomal genes 45S and 5S and distribution of satellite DNA pPh2004 sites shown to be variable among the species. The (GATA)_n and telomeric (TTAGGG)_n sequences exhibited similar pattern in *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2 and *A. machrisi*. In this work, we described the first reports of ribosomal genes co-location for Parodontidae, being observed in *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi* and *A. davisii*, and also the polymorphism involving the two ribosomal sequences of *A. davisii*. Analysis of histones H1 and H4 localization represent the first study of histone genes in the family and showed that the seven collected species have co-location of these sequences in a chromosome pair, occurring one additional site of H1 in *A. davisii*, and dispersed sites of this sequence by the chromosomes of the species. Chromosomal analysis and DNA Barcode performed in *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp.1, *Apareiodon* sp. 2 and *A. machrisi* showed recent divergence among these individual groups, suggesting that *Apareiodon* sp. 2 is a possible new species, and *Apareiodon* sp. 1 is a population of *A. machrisi*. This work contributed to the knowledge of the genetic diversity of

Parodontidae, presenting unpublished chromosomal and molecular data of this family. General analysis of chromosomal data of this family revealed conservation of karyotype macrostructure, however, more detailed analyzes indicated the occurrence of a great variety of chromosomal microstructural level. The results presented in this study, along with that available in literature, indicated that this microstructure chromosome diversity is clearly linked to repetitive DNAs dynamics.

Keywords: fish, classical cytogenetics, molecular cytogenetics, DNA barcode, chromosome evolution

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam um grupo de vertebrados com grande diversidade morfológica, biológica e de habitats (Nelson, 2006). De acordo com Eschmeyer & Fong (2015), são consideradas válidas 33.592 espécies, as quais se encontram distribuídas em 5.136 gêneros.

A região Neotropical apresenta a maior fauna de peixes de água doce conhecida, com cerca de 8.000 espécies (Graça & Pavanelli, 2007). Os conhecimentos sobre peixes neotropicais dulcícolas tem se expandido consideravelmente nos últimos anos, entretanto, ainda há muita diversidade inexplorada.

Neste cenário, os estudos cromossômicos e moleculares vêm contribuindo expressivamente para o conhecimento desse grupo de vertebrados, apresentando informações relevantes sobre os processos evolutivos que promovem sua diversidade, e auxiliando na resolução de questões relacionadas à taxonomia, biogeografia e filogenia.

1.1. Aspectos gerais da ordem Characiformes

Characiformes representa o grupo mais numeroso entre os Ostariophysi, com 2.083 espécies consideradas válidas (Eschmeyer & Fong, 2015). As espécies pertencentes a este grupo ocorrem na região Neotropical, entre o sul do México e o sul da Argentina, e na África, sendo encontradas em praticamente todos os ambientes de água doce (Lucena, 1993).

Do ponto de vista morfológico, as espécies dessa ordem geralmente apresentam dentes desenvolvidos, corpo recoberto por escamas, nadadeiras pélvicas presentes, nadadeira anal curta ou moderadamente longa, linha lateral oblíqua, barbilhões ausentes e nadadeira caudal com cerca de 19 raios (Nelson, 1994).

Encontra-se subdivida em 23 famílias, entre as quais Parodontidae está inserida (Eschmeyer & Fong, 2015).

1.2. Aspectos gerais da família Parodontidae

Parodontidae é composta por três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Pavanelli & Britski, 2003), que abrangem 32 espécies consideradas válidas (Tab.1). Destas, 16 são encontradas em território brasileiro (Tab. 2).

Conhecidos popularmente como “canivetes” ou “charutos” no Brasil e como “virolitos” ou “rollizos” em outras localidades da América Latina, habitam geralmente rios de água corrente e de fundo rochoso, especialmente corredeiras e cachoeiras, onde permanecem sob o fundo, raspando e ingerindo os organismos que ali se desenvolvem (Nakatani et al., 2001). Encontram-se distribuídos na América do Sul e parte do Panamá, exceto na Patagônia e canal do rio Amazonas (Pavanelli & Britski, 2003).

Os parodontídeos se distinguem dos outros grupos de Characiformes pela ausência de lábio superior, presença de dentes pré-maxilares frouxamente ligados ao osso pré-maxilar através da face posterior de seu pedúnculo, presença de lamelas ósseas separando as trincheiras de dentes do osso pré-maxilar, dentes mandibulares (quando presentes) localizados na região lateral da abertura bucal e direcionados para dentro da cavidade bucal, ângulo-articular dobrado sobre a margem dorsal da parte posterior do dentário cobrindo parcialmente sua face medial e lateral, e abertura dorsal da fossa pós-temporal delimitada somente pelo parietal e epoccipital (Ingenito, 2008).

Os gêneros de Parodontidae são tradicionalmente caracterizados através do número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais e ausência de dentes na região látero-posterior da mandíbula (Eigenmann, 1916; Ingenito & Buckup, 2005). De acordo com Ingenito & Buckup (2005), os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* apresentam um raio indiviso nas nadadeiras peitorais, enquanto *Saccodon* possui dois. As espécies pertencentes a esta família possuem mandíbula em forma de pá de bordo reto, sem dentes na borda anterior. O pré-maxilar é bordado por uma fileira de dentes delicados, cuspidados, sendo tais cúspides arredondadas (Britski, 1972). O gênero *Parodon* apresenta pequenos dentes laterais na mandíbula, enquanto *Apareiodon* e *Saccodon* não os possuem. O número

de cúspides dos dentes pré-maxilares é um forte caráter para a diagnose das espécies de *Parodon* e *Apareiodon*, enquanto que em *Saccodon* este caráter não pode ser considerado, já que tais espécies apresentam acentuado polimorfismo dentário (Roberts, 1974a; Garavello, 1977).

No âmbito taxonômico, Parodontidae mostra-se confusa em função da inexistência de caracteres diagnósticos fortes para o agrupamento dos representantes deste grupo (Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito, 2008; Bellafronte et al., 2011). As poucas diferenças morfológicas existentes *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon* poderiam ser questionadas (Roberts, 1974b). De acordo com Starnes & Schindler (1993), Moreira (2007) e Ingenito (2008), *Saccodon* corresponde a um clado monofilético, sendo considerado o grupo-irmão dos demais integrantes de Parodontidae. Entretanto, *Parodon* e *Apareiodon*, em sua concepção tradicional, correspondem a grupos polifiléticos, sendo que a presença/ausência de dentes mandibulares não é um caráter informativo na diagnose destes grupos (Ingenito, 2008). Por outro lado, Bellafronte et al. (2013), utilizando-se de marcadores moleculares, sugerem que *Parodon* e *Apareiodon* correspondem a unidades biológicas bem definidas e distintas dentro da família Parodontidae.

1.3. Estudos cromossômicos e DNA Barcode em Parodontidae

Entre as espécies pertencentes à Parodontidae, 11, alocadas nos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, apresentam estudos citogenéticos, (Tab. 3). O gênero *Saccodon*, até o presente momento, não apresenta nenhum dado citogenético.

Em Parodontidae o número diploide ($2n$) igual a 54 cromossomos mostra-se constante, e os cariótipos são constituídos preferencialmente por cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subteloicêntricos (st), com blocos heterocromáticos centroméricos em praticamente todos os cromossomos do complemento, bem como blocos terminais (Moreira-Filho et al., 1980, 1984, 1993; Jesus & Moreira-Filho, 2000a, b; Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009; Vicari et al., 2010; Schemberger et al., 2011).

Sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos são comumente encontrados em diferentes espécies desta família. O sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ é verificado em *A. affinis*, enquanto que o sistema ZZ/ZW é encontrado em *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. (rio Verde), *A. vladii*, *P. moreirai* e *P. hilarii* (Moreira-Filho et al., 1980,1993; Centofante et al., 2002; Vicari et al., 2006; Rosa et al., 2006; Bellafronte et al., 2009; Bellafronte et al., 2011; Bellafronte et al., 2012). Estudos cromossômicos recentes têm mostrado que elementos repetitivos de diferentes naturezas se acumulam na região de diferenciação do cromossomo W presente nas espécies portadoras de sistemas de cromossomos sexuais, indicando assim a participação destes elementos no surgimento destes sistemas (Schemberger et al., 2014; Ziemnickzak et al., 2015.)

Entre os membros da família Parodontidae são observadas diferenças numéricas e posicionais dos sítios de rDNA 45S (detectados por Ag-NOR e hibridização *in situ* fluorescente), sendo que a condição simples destes genes é encontrada em *A. affinis*, *A. piracicabae*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp. (rio Verde), *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*, enquanto que *A. ibitiensis*, *A. hasemani* e *A. vitattus* apresentam sítios múltiplos. Sítios de rDNA 5S múltiplos são evidenciados apenas em *A. vladii*, já os sítios simples ocorrem em *A. affinis*, *A. ibitiensis*, *A. hasemani*, *A. piracicabae*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Jesus & Moreira-Filho, 2000a,b; Jorge & Moreira-Filho, 2000, 2004; Vicente et al., 2001; Centofante et al., 2002; Bellafronte et al., 2005; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2011; Bellafronte et al., 2012). Um caso de sintonia entre os sítios ribossomais 18S e 5S foi identificado em *P. nasus* (Vicente et al., 2001; Bellafronte et al., 2005).

Para este grupo, há descrição de duas famílias de DNA repetitivo: o pPh2004, que constitui parte de uma fração repetitiva isolada a partir do DNA genômico de *P. hilarii*. (Vicente et al., 2003) e uma fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (rio Verde) nomeada de WAp (Schemberger et al., 2011). O DNA satélite pPh2004 encontra-se presente em *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* e parece atuar na diversificação do genoma das espécies de

Parodontidae, não estando relacionado à diferenciação do sistema de cromossomos sexuais simples (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). A presença deste DNA satélite não é observada em *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vladii* e *A. vittatus*, possivelmente em função destas espécies formarem um clado que se diferenciou isoladamente em relação às espécies que o possuem (Bellafronte et al., 2011; Bellafronte et al., 2012). Já a fração repetitiva WAp foi observada em regiões terminais dos cromossomos de todas as espécies estudadas (*A. affinis*, *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vladii*, *A. vittatus*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*), e deve ter sido responsável pela diferenciação do sistema de cromossomos sexuais em Parodontidae (Schemberger et al., 2011; Bellafronte et al., 2012).

Com base em caracteres citogenéticos clássicos e moleculares, Bellafronte et al. (2011) e Schemberger et al. (2011) propuseram *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* poderiam representar um agrupamento distinto de *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. ibitiensis* e *A. vladii* entre os Parodontidae, já que compartilham um conjunto de marcadores cromossômicos.

Bellafronte et al. (2013) analisaram várias espécies de Parodontidae através da sequência parcial do gene da citocromo C oxidase I e observaram que este gene é eficaz na identificação das espécies. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* representem unidades distintas, não corroborando assim a proposição de Bellafronte et al. (2011).

1.4. Estudos de DNAs repetitivos, com ênfase em peixes neotropicais

Os DNAs repetitivos compreendem uma grande parcela do genoma dos eucariotos (Martins, 2007), e têm se mostrado como fundamentais e promissores em estudos relacionados à evolução cromossômica.

Encontram-se incluídos nesta classe os DNAs satélites (satDNA), microsatélites, minissatélites e famílias multigênicas, que correspondem a sequências repetitivas organizadas em *tandem*; e transposons e retrotransposons os quais representam sequências de DNA repetitivo

disperso com capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma (Maxon et al., 1983; Hadjiolov, 1985; Charlesworth et al., 1994).

Os DNAs satélites vêm se tornando importantes ferramentas em estudos cromossômicos em peixes neotropicais. Há descrição de várias famílias de satDNA já prospectadas a partir do genoma de diferentes espécies de peixes, como por exemplo: Hop (Haaf et al., 1993) e 5SHindIII (Martins et al., 2006) isoladas de *Hoplias malabaricus*; As51 isolado por Mestriner et al. (2000) de *Astyanax scabripinnis*; SATH1 e SATH2 isolados por restrição genômica de *Prochilodus lineatus* (Jesus et al., 2003); pPh2004 isolado de *P. hylarii* (Vicente et al., 2003); Al-HindIII isolado de *Achirus lineatus* por Azevedo et al. (2005). Outras classes de DNAs repetitivos inicialmente isolados a partir genoma de outros animais, como a sequência GATA, também têm sido utilizadas na análise cromossômica de peixes neotropicais (Eppelen et al., 1982).

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n constitui outra fração repetitiva organizada em *tandem* importante no estudo de evolução cromossômica em peixes neotropicais (Slijepcevic, 1998; Rosa et al., 2011). Os minisatélites (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeat*) também têm se mostrado importantes ferramentas em estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (Martins, 2007). Já para os microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeat*) poucos são os trabalhos com mapeamento físico em peixes neotropicais (Hatanaka et al., 2002; Vanzela et al., 2002; Cioffi et al., 2011; Yano et al., 2014).

Dentre as famílias multigênicas do genoma dos eucariotos, as famílias dos genes ribossomais representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos. Inúmeros trabalhos realizados com sondas de rDNA 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios através de hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais (Martins & Galetti, 1999, 2000; Vicente et al., 2001; Martins et al., 2006; Vicari et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Garcia et al., 2010; Pansonato-Alves et al., 2011; Scacchetti et al., 2012). Outra família de marcadores importante em estudos cromossômicos é a dos genes histônicos, contudo seus estudos em peixes mostram-se

restritos apenas a algumas espécies (Pendás et al., 1994; Hashimoto et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2013a; Pansonato Alves et al., 2013b; Silva et al., 2013; Costa et al., 2014).

Em relação às sequências de DNA repetitivo disperso, tanto os transposons como os retrotransposons vêm sendo isolados e mapeados nos cariótipos de peixes neotropicais, com o intuito de compreender o papel destes elementos transponíveis na diversificação e evolução cromossômica do grupo (Parise-Maltempi et al., 2007; Teixeira et al., 2009; Ferreira et al., 2011a, b; Ferreira et al., 2011c).

1.5. Bacia do Tocantins-Araguaia

A bacia hidrográfica dos rios Tocantins-Araguaia possui uma área de 918.822 Km² (11% do território nacional) abrangendo os estados de Goiás (21%), Tocantins (30%), Pará (30%), Maranhão (4%), Mato Grosso (15%) e o Distrito Federal (0,1%) (ANA, 2015). Nesta região hidrográfica estão presentes os biomas Floresta Amazônica, ao norte e noroeste, e Cerrado nas demais áreas (ANA, 2015).

Os principais formadores do rio Tocantins são: rio das Almas, que nasce próximo à cidade de Pirenópolis (GO), rio Maranhão, que nasce próximo à cidade de Planaltina (GO), e rio Paranã, que nasce próxima à cidade de Formosa (GO). É caracterizado pela presença de corredeiras e cachoeiras.

O rio Araguaia tem sua nascente no limite sul da divisa entre os estados de Mato Grosso e Goiás, em uma altitude de 850 metros. Segundo Innocêncio (1989), o rio Araguaia percorre 2.115 Km e pode ser considerado um rio de planície, característica atribuída à horizontalidade de grande parte das elevações da região Centro-Oeste. Desse modo, suas águas podem ser consideradas relativamente calmas.

1.6. Bacia do Jaguaribe

O rio Jaguaribe corresponde ao maior curso d'água existente em solo cearense (Pompeu Sobrinho, 1962). Nasce na Serra da Joanhina, município de Tauá, e percorre aproximadamente 633 Km até a sua foz no oceano Atlântico (CSBH, 2015). Tem como principais afluentes os rios Salgado e Banabuiú.

A bacia hidrográfica do rio Jaguaribe drena uma área de aproximadamente 75.669 Km² (Gatto, 1999). Encontra-se situada em sua quase totalidade no estado do Ceará, com ínfima parcela estendendo-se para o estado de Pernambuco (Gatto, 1999). Devido a sua grande extensão e heterogeneidade, foi dividida em cinco regiões hidrográficas: Alto Jaguaribe, Salgado, Médio Jaguaribe, Banabuiú e Baixo Jaguaribe (CSBH, 2015). Dentro dessa bacia são encontrados dois grandes açudes, Orós e Castanhão, os quais garantem a perenização do rio até sua foz (CSBH, 2015).

1.7. Referências

- ANA (2015). **Agência Nacional das Águas: Tocantins-Araguaia**. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/TocantinsAraguaia.aspx>. Acesso setembro de 2015.
- Azevedo, M.F.C.; Oliveira, C.; Martins, C.; Wasko, A.P.; Foresti, F. (2005). Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). **Genetica**. 125(2):205-210.
- Bellafronte, E.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**. 28:710-716.
- Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**. 75:2313-2325.

- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559-570.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Artoni, R.F.; Moreira Filho, O.; Vicari, M.R. (2012). Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**. 35(4):770-776.
- Bellafronte, E.; Mariguela, T.C; Pereira, L.H.G; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**. 11(3):497-506.
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: **Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 55:139-150.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371:215-220.
- Cioffi, M.B.; Kejnovsky, E.; Bertollo, L.A.C. (2011). The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 132:289-296.
- Costa, G.W.W.F.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2014). Unusual Dispersion of Histone Repeats on the Whole Chromosomal Complement and Their Colocalization with Ribosomal Genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144(1):62-67.

- CSBH Médio Jaguaribe (2015). **Conheça nossa bacia hidrográfica**. Disponível em: <http://www.csbhmj.com.br/conheca/>. Acesso setembro de 2015.
- Eigenmann, C.H. (1916). On *Apareiodon*, a new genus of characid fishes. **Annals of the Carnegie Museum**. 10:71-76.
- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2015). **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Parodontidae>. Acesso agosto de 2015.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C; Foresti, F. (2011a). Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 132(1-2):64-70.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011b). A new dispersed element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). **Mobile Genetic Elements**. 1:1-4.
- Ferreira, D.C.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011c). Transposable elements as a potential source for understanding fish genome. **Mobile Genetic Elements**. 1:1-6.
- Ferreira, I.A., Bertollo, L.A.C.; Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**. 118:78-83.
- Garavello, J.C. (1977). Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae) **Revista Brasileira de Biologia**. 37:447-455.

- Garcia, C.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**. 9:364-385.
- Gatto, L.C.S. (1999). **Diagnóstico ambiental da bacia do rio Jaguaribe: Diretrizes gerais para a ordenação territorial**. Salvador: IBGE.
- Graça, W.; Pavanelli, C.S. (2007). **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM.
- Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti Jr.; P.M.; Willard, H.F. (1993). Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chromosome Research**. 1:77-86.
- Hadjiolov, A.A. (1985). The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. In: **Cell Biology Monographs**. Nova Iorque: Springer-Verlag.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species. **Cytogenetic and Genome Research**. 134:64-71.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti Jr., P.M. (2002). A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**. 98:308-310.
- Ingenito, L.F.S.; Backup, P.A. (2005). A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia**. 5:765-771.
- Ingenito, L.F.S. (2008). **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes)**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.
- Innocêncio, N.R. (1989). Hidrografia. In: **Geografia do Brasil, Região Centro-Oeste**. Rio de Janeiro: IBGE.

- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000a). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**. 65:397-402.
- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000b). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. 11:75-80.
- Jesus, C.M.; Galetti, P.M.Jr.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**. 118:25-32.
- Jorge, L.C.; Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**. 109: 267-273.
- Jorge, L.C.; Moreira-Filho, O. (2004). Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 57:203-207.
- Lucena, C.A.S. (1993). **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariopysi, Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**. 8:353-355.
- Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti Jr. P.M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**. 127:133-141.
- Martins, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Fish Cytogenetics. Noya Iorque: Science Publisher.

- Maxon, R.; Cohn, R.; Kedes, L. (1983). Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**. 17:239-277.
- 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. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**. 85:1-9.
- Moreira, C.R. (2007). **Relações filogenéticas da ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 33:83-91.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 26:564-568.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**. 46:115-125.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). **Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM.
- Nelson, J.S. (1994). **Fishes of the world**. Nova Iorque: Wiley-Interscience.
- Nelson, J.S. (2006). **Fishes of the world**. Nova Iorque: Wiley-Interscience.
- Pansonato-Alves, J.C.; Vicari, M.R.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011). Chromosomal diversification in populations of *Characidium* cf. *gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of Fish Biology**. 78: 183-194.

- Pansonato-Alves, J.C.; Hilsdorf, A.W.S.; Utsunomia, R.; Silva, D.M.Z.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013a). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 141:133-142.
- Pansonato-Alves, J.C.; Serrano, E.A.; Utsunomia, R.; Scacchetti, P.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013b). Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 23:477-489.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): New insights for the sex chromosome in *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**. 116:218-223.
- Pavanelli, C.S.; Britski, H.A. (2003). *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia basin, with description of three new species. **Copeia**. 2:337-348.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**. 10:147-152.
- Pompeu Sobrinho, T. (1962). **Esboço fisiográfico do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Universitária do Ceará.
- Roberts, T.R. (1974a). Dental polymorphism and systematics in *Saccodon*, a neotropical genus of freshwater fishes (Parodontidae, Characoidei). **Journal of Zoology**. 173:303-321.
- Roberts, T.R. (1974b). Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. 146:411-472.

- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2011). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22(3):739-749.
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006). Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S DNAr genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**. 128:159-166.
- Scacchetti, P.C.; Alves, J.C.P.; Utsunomia, R.; Claro, F.L.; Almeida-Toledo, L.F.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2012). Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the Genomes of the *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 136:131-137.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11(6):518-527.
- Silva, D.M.Z.A.; Pansonato-Alves, J.C.; Utsunomia, R.; Daniel, S.N.; Hashimoto, D.T.; Oliveira C, Porto-Foresti, F.; Foresti, F. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**. 141:329-336.
- Slijepcevic, P. (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**. 107:136-140.

- Starnes, W.C.; Schindler, I. (1993). Comments on the genus *Apareiodon* Eigenmann (Characiformes: Parodontidae) with the description of a new species from the Gran Sabana region of Eastern Venezuela. **Copeia**. 1993:754-762.
- 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. (2009). 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**. 125:224-234.
- Vanzela, A.L.L.; Swarça, A.C.; Dias, A.L.; Stolf, R.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Sbalqueiro, I.J.; Giuliano-Caetano, L. (2002). Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia**. 67:9-13.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetics and Genome Research**. 114:163-168.
- 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. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:365-369.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Yano, C.F.; Poltronieri, J.; Bertollo, L.A.C. Artoni, R.F.; Liehr, T., Cioffi, M.B. (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae,

Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **Plos One**. 9(3):1-7.

Ziemniczak, K.; Traldi, J.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2015). In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144(4):325-332.

1. 8. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies válidas para a família Parodontidae.

<i>Parodon</i>	<i>Apareiodon</i>	<i>Saccodon</i>
<i>Parodon alfonsoi</i> Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011	<i>Apareiodon affinis</i> (Steindachner, 1879)	<i>Saccodon dariensis</i> (Meek & Hildebrand, 1913)
<i>Parodon apolinari</i> Myers, 1930	<i>Apareiodon agmatos</i> (Taphorn, López-Fernández & Bernard, 2008)	<i>Saccodon terminalis</i> (Eigenmann & Henn, 1914)
<i>Parodon atratoensis</i> Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011	<i>Apareiodon argenteus</i> Pavanelli & Britski, 2003	<i>Saccodon wagneri</i> Kner, 1863
<i>Parodon bifasciatus</i> Eigenmann, 1912	<i>Apareiodon cavalcante</i> Pavanelli & Britski, 2003	
<i>Parodon buckleyi</i> Boulenger, 1887	<i>Apareiodon davisii</i> Fowler, 1941	
<i>Parodon caliensis</i> Boulenger, 1895	<i>Apareiodon gransabana</i> Stanes & Schindler, 1993	
<i>Parodon carrikeri</i> Fowler, 1940	<i>Apareiodon hasemani</i> Eigenmann, 1916	
<i>Parodon guyanensis</i> Géry, 1959	<i>Apareiodon ibitiensis</i> Campos, 1944	
<i>Parodon hilarii</i> Reinhardt, 1866	<i>Apareiodon itapicuruensis</i> Eigenmann & Henn, 1916	
<i>Parodon magdalenensis</i> Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011	<i>Apareiodon machrisi</i> Travassos, 1957	
<i>Parodon moreirai</i> Ingenito & Buckup, 2005	<i>Apareiodon piracicabae</i> (Eigenmann, 1907)	
<i>Parodon nasus</i> Kner, 1859	<i>Apareiodon vittatus</i> Garavello, 1977	
<i>Parodon orinocensis</i> (Bonilla, Machado-Alison, Silveira, Chernoff, Lopez & Lasso, 1999)	<i>Apareiodon vladii</i> Pavanelli, 2006	
<i>Parodon pongoensis</i> (Allen, 1942)	<i>Apareiodon tigrinus</i> Pavanelli & Britski, 2003	
<i>Parodon suborbitalis</i> Valenciennes, 1850		

Tabela 2. Espécies da família Parodontidae encontradas em território brasileiro.

<i>Parodon</i>	Bacia Hidrográfica
<i>Parodon hilarii</i>	São Francisco
<i>Parodon nasus</i>	Paraná e Paraguai
<i>Parodon moreirai</i>	Paraná
<i>Parodon pongoensis</i>	Tocantins-Araguaia
<i>Apareiodon</i>	Bacia Hidrográfica
<i>Apareiodon affinis</i>	Paraná e Paraguai
<i>Apareiodon argenteus</i>	Tocantins-Araguaia
<i>Apareiodon cavalcante</i>	Tocantins-Araguaia
<i>Apareiodon davisii</i>	Atlântico Nordeste
<i>Apareiodon hasemani</i>	São Francisco
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Paraná e São Francisco
<i>Apareiodon itapicurensis</i>	Atlântico Leste
<i>Apareiodon machrisi</i>	Tocantins-Araguaia
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Paraná e São Francisco
<i>Apareiodon vittatus</i>	Iguaçu
<i>Apareiodon vladii</i>	Paraná
<i>Apareiodon tigrinus</i>	Tocantins-Araguaia

Tabela 3. Espécies de *Parodon* e *Apareiodon* que apresentam estudos citogenéticos até o momento.

<i>Parodon</i>	<i>Apareiodon</i>
<i>Parodon hilarii</i>	<i>Apareiodon affinis</i>
<i>Parodon moreirai</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>
<i>Parodon nasus</i>	<i>Apareiodon hasemani</i>
<i>Parodon pongoensis</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>
	<i>Apareiodon vittatus</i>
	<i>Apareiodon vladii</i>
	<i>Apareiodon</i> sp. (rio Verde)

2. JUSTIFICATIVA

Parodontidae é uma família de peixes com reduzido número de espécies (32 espécies válidas), quando comparada a outros grupos neotropicais. Do ponto de vista cromossômico, a família apresenta considerável variabilidade cromossômica representada principalmente por distintos sistemas de cromossomos sexuais: ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂. Neste contexto, corresponde a um interessante grupo para estudos de taxonomia, sistemática e processos de diferenciação e evolução cromossômica.

Apesar do seu reduzido número de espécies constituintes, os estudos citogenéticos para Parodontidae ocorrem principalmente para espécimes alocados nas bacias hidrográficas brasileiras do sul e sudeste. Desta maneira, análises cromossômicas de espécies endêmicas das regiões centro-oeste e nordeste representam um promissor aprofundamento no conhecimento da diversidade cromossômica do grupo, auxiliando na compreensão da sua evolução cromossômica.

Desde o surgimento da citogenética, os marcadores clássicos vêm se mostrando como importantes ferramentas no conhecimento e compreensão da diversidade cromossômica dos peixes neotropicais. Entretanto, as informações obtidas através da citogenética molecular, especialmente em relação à utilização de DNAs repetitivos, associada aos dados clássicos, tem ampliado a resolução na identificação dessas variações e permitido a elaboração de hipóteses de evolução cromossômica mais consistentes para vários grupos de peixes neotropicais.

3. OBJETIVOS

O presente projeto teve por intuito contribuir para o conhecimento da biodiversidade, processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica de Parodontidae, no que se refere a caracteres diagnósticos que embasem esses processos, analisando principalmente espécies do gênero *Apareiodon* pertencentes às bacias hidrográficas das regiões centro-oeste e nordeste. Para tanto, foi proposto:

- Analisar cromossomicamente espécies de *Apareiodon* provenientes das bacias hidrográficas dos rios Tocantins-Araguaia e Jaguaribe, não estudadas até o momento;
- Isolar famílias de DNA repetitivos a partir das espécies desse gênero, analisando sua distribuição e localização cromossômica por hibridização *in situ* fluorescente;
- Investigar a distribuição de sequências repetitivas da família Parodontidae, pPh2004 e WAp, nas espécies de *Apareiodon* das bacias dos rios Tocantins-Araguaia e Jaguaribe;
- Investigar o papel exercido pelos DNAs repetitivos na evolução cromossômica ocorrida neste grupo, associando os caracteres da citogenética clássica e molecular numa análise comparativa entre as diferentes espécies.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras coletadas

Foram coletados exemplares de seis espécies do gênero *Apareiodon* e uma do gênero *Parodon*, as quais se encontram nas bacias dos rios Tocantins-Araguaia e Jaguaribe (Tab. 1; Figs. 1,2). Todas as coletas foram realizadas com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - licença N° 10538-1).

Todas as espécies foram identificadas pela Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli, e encontram-se depositadas na Coleção Icitológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Tab. 1).

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética de Peixes, do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foram mantidos vivos em aquários aerados até serem processados para a obtenção dos cromossomos metafásicos.

Foram armazenados tecidos dos exemplares coletados, para extração do DNA genômico.

4.2. Caracterização dos locais de coleta

Os 69 espécimes de *A. cavalcante* foram coletados na cidade de Cavalcante (GO), no rio Claro, que é afluente do rio Preto, o qual desagua na margem direita do rio Maranhão entre as barragens de Serra da Mesa e Cana-Brava (Figs. 3,4).

Os 19 exemplares de *Apareiodon* provisoriamente denominados sp. 1 foram coletados na cidade de Uruaçu (GO), no rio Passa-Trezeinho, o qual é tributário da margem direita do rio Passa-Três, que por sua vez desagua no lago da usina hidrelétrica de Serra da Mesa, formado pelo represamento das águas do rio Maranhão e rio das Almas (Fig. 5).

Os 19 exemplares de *Apareiodon* provisoriamente denominados sp. 2 foram coletados na cidade de Formosa (GO), no rio Bandeirinha, tributário da margem esquerda do rio Paranã (Fig. 5). O rio Paranã desagua na margem direita no rio Maranhão, e, a partir desta confluência, o rio Maranhão é denominado rio Tocantins.

Os 49 espécimes de *A. machrisi* foram coletados na cidade de Campinorte (GO), no ribeirão Cristalino, o qual é tributário da margem direita do rio Cana-Brava, que por sua vez desagua na margem esquerda do rio Maranhão, a montante da confluência com o rio Paranã e a jusante da barragem de Cana-Brava. (Fig. 6)

Os 8 espécimes de *A. argenteus* e 19 de *P. cf. pongoensis* foram coletados na cidade de Aragarças (GO), na margem direita da calha principal do rio Araguaia (Fig. 7).

Os 53 espécimes de *A. davisii* foram coletados na cidade de Icó (CE), no rio Salgado, o qual é tributário da margem direita do rio Jaguaribe (Fig. 8).

4.3. Metodologia Citogenética Clássica

4.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

4.3.1.1. Tratamento “*in vivo*”

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, por meio da técnica descrita por Bertollo et al. (1978). Foi injetada no animal, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso. Posteriormente, os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos. Decorrido esse tempo, os animais foram sacrificados e foram retiradas porções do rim. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), sendo transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10mL desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, sendo completado este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão

celular homogênea. Posteriormente, esta suspensão foi incubada a 36 - 37°C, durante 20 minutos. O material foi re-suspendido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador recém-preparado (metanol : ácido acético - 3 : 1) foram acrescentadas ao material, que foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm, descartando-se o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Foram adicionados, vagarosamente, 5 - 7mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1mL de fixador, misturando bem o material.

O material obtido foi então guardado em freezer, acondicionado em pequenos microtubos, ou gotejado sobre lâminas para a análise. Neste caso, foram gotejadas 3 - 4 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, mantida em água destilada na geladeira, ou sobre uma lâmina seca aquecida por volta de 25 - 30°C, em chapa aquecedora. Escorreu-se, então, o excesso de material, inclinando levemente a lâmina sobre um papel de filtro. As lâminas foram secas diretamente ao ar e coradas com o corante Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 - 8 minutos.

4.3.1.2. Tratamento “*in vitro*”

Os cromossomos foram obtidos segundo o protocolo descrito por Foresti et al. (1993). Fragmentos do rim foram colocados em 10 mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrífuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, foram adicionadas 1 - 2 gotas de solução de Colchicina 0,016%, misturando-as bem com o material. O material foi então transferido para estufa a 36°C, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 500 - 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 10mL de solução hipotônica (KCl 0,075M),

misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi transferido novamente para estufa a 36°C, por mais 30 minutos. Posteriormente, foram adicionadas cerca de 6 gotas de fixador (metanol : ácido acético – 3:1) misturado-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 10mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Nova centrifugação de 10 minutos foi realizada e o processo de fixação foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material foi diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Por fim, o material foi gotejado sobre lâminas bem limpas e aquecidas entre 25 - 30°C. Após a secagem ao ar, procedeu-se a coloração do material com solução Giemsa 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 - 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

4.3.1.3. Tratamento em campo

Foi utilizado o protocolo descrito por Blanco et al. (2012) para espécimes que não puderam ser transportados para o laboratório para o processamento. Os animais foram submetidos ao tratamento convencional com Colchicina (injeção intraperitoneal de solução de Colchicina 0,025%) e mantidos vivos por 30 - 45 minutos. Subsequentemente, os animais foram sacrificados. Porções do rim anterior foram removidas e dissociadas em solução hipotônica (KCl 0,075M), com o auxílio de seringas hipodérmicas. A suspensão celular resultante foi transferida para tubos de centrífuga e mantida em temperatura ambiente (26 - 28°C) por 30 minutos. Após a incubação, 2mL de fixador (metanol : ácido acético – 3:1) foram adicionados ao tubo e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os tubos foram mantidos em refrigeração até chegarem no laboratório, onde foram submetidos a fixações, conforme descrito por Bertollo et al. (1978).

4.3.2. Bandamento C

Foi adotado o procedimento descrito por Sumner (1972). As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 60°C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60°C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8), durante 7 minutos. Alternativamente, o material foi corado com solução de iodeto de propídio e analisado em microscopia de fluorescência (Lui et al., 2012).

4.3.3. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)

Foi adotado o procedimento descrito por Howell & Black (1980). Sobre a lâmina com cromossomos foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100mL de água destilada e 0,5mL de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de nitrato de prata (50%). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em estufa a 60°C por um período de aproximadamente três minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da mesma. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e corada rapidamente durante 20 - 30 segundos com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato (pH 6,8).

4.4. Metodologia Citogenética Molecular

4.4.1. Isolamento de DNAs repetitivos

Os DNAs ribossômicos 18S e 5S e o DNA satélite pPh2004 foram amplificados a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004), Martins & Galetti Jr. (2001) e Vicente et al. (2003), respectivamente. Realizou-se o procedimento de Mini-preparação plasmidial a partir de colônias de *Escherichia coli* transformadas pela inserção dos genes de interesse acoplados ao

plasmídio M13, armazenadas a -80°C . Inicialmente, as colônias armazenadas a -80°C foram plaqueadas e incubadas a 37°C . Posteriormente uma colônia com o inserto desejado foi pinçada e incubada a 37°C sob agitação por 12 horas. Foram centrifugados 2mL de cultura a 13.000rpm por 1 minuto, descartando o sobrenadante. Em seguida, este processo foi realizado para o restante da cultura. Foram adicionados 400 μL da solução I (40 μL de RNase 20mg/mL + 200 μL de TRIS-HCl 1M + 40 μL de EDTA 0,5M + 1720 μL de H_2O), e o material foi agitado. Foram adicionados 400 μL da solução II (400 μL de NaOH 1M + 200 μL de SDS 10% + 1400 μL de H_2O) e misturou-se o material por inversão do tubo. Adicionou-se 400 μL da solução III (1,2mL de acetato de potássio 5M + 230 μL de ácido acético + 570 μL de H_2O) e misturou-se o material. Centrifugou-se o material a 13.000rpm por 5 minutos, transferindo o sobrenadante para um tubo limpo. Adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol 100% e misturou-se. O material foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 300 μL de etanol 70%. Centrifugou-se o material por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Secou-se o material em estufa a 37°C e acrescentou-se 20 μL de água ou TE para ressuspender.

A fração repetitiva WAp foi amplificada através de reações de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed - Polymerase Chain Reaction), a partir da microdissecção da porção heterocromática do cromossomo W efetuada por Schemberger et al. (2011).

As sequências parciais dos genes das histonas H1 e H4 foram amplificadas a partir do genoma de *A. cavalcante* utilizando os primers H1f (5'- ATGGCAGAARYCGCMCCAGC -3') e H1r (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3'), H4F2s (5 -TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3) e H4F2er (5- CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3) descritos por Hashimoto et al. (2011) e Pineau et al. (2005), respectivamente. As reações foram realizadas para um volume final de 25 μL , contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0,2 μM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 1,5mM de cloreto de magnésio, Buffer 10x (s/ cloreto) e água

destilada. As condições do ciclo de PCR foram: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, com posterior ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Outras classes de DNAs repetitivos foram obtidas através de reações de PCR na ausência de DNA molde. O DNA telomérico (TTAGGG)_n foi amplificado utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al., 1991) e a sequência (GATA)_n foi obtida com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Epplen et al., 1982). O mix das reações de PCR foi composto por 2,5 mM de MgCl₂; 160 μM de dNTPs; 0,1 μM de cada primer e 2U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições do ciclo de PCR foram 94°C/5 min; 9 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/30 seg, 72°C/1 min; 29 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/30 seg, 72°C/90 seg; com extensão final de 72°C/5min.

4.4.2. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16-dUTP e digoxigenina 11-dUTP (Roche). O produto da reação foi precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13.000rpm, descartando-se o sobrenadante, deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37°C. As sondas de rDNA 18S, (TTAGGG)_n, (GATA)_n, pPh2004 e H1 foram marcadas com biotina 16-dUTP, enquanto as sondas de rDNA 5S e H4 foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP. Apenas a sonda de WAp foi marcada através de reações de DOP-PCR com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science).

4.4.3. Hibridização *in situ* fluorescente

A localização dos sítios dos DNAs repetitivos nos cromossomos foi obtida pela hibridização fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel et al. (1986). Foram utilizados como sondas os seguintes

elementos repetitivos: os DNAs ribossomais 18S e 5S; os DNAs satélites pPh2004 e WAp; os genes das histonas H1 e H4, e as sequências (GATA)_n e (TTAGGG)_n.

4.4.3.1. Simples Hibridização *in situ* fluorescente (Simple-FISH)

As lâminas foram incubadas em RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 12µL de sonda, 30µL de formamida (concentração final de 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 37°C, por 6 minutos cada e posteriormente incubadas em 1xPBD (200mL de 20xSSC, 6mL de Triton 100, 10g de leite desnatado, 800mL de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3,5µL de avidina-FITC (diluição de 1:100 - Sigma) e 27µL de tampão C (0,1M de NaHCO₃, pH 8,5 e 0,15M de NaCl) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos cada, foram realizados 3 ciclos de amplificação do sinal utilizando uma solução de anti-avidina-biotina conjugada (2µL de anti-avidina e 38µL de 1xPBD por lâmina), durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos, cada lâmina foi tratada com 3,5µL de FITC (1:100) + tampão C, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram contra-corados com DAPI (0,2µg/mL) diluído em uma solução “antifading” (Fluka).

4.4.3.2. Dupla Hibridização *in situ* fluorescente (Double-FISH)

As lâminas foram incubadas em RNase (0,4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. Foram

aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50µL da solução de hibridação permanecendo por 16 horas a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubadas com 90µL de tampão NFDm a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e lavadas duas vezes com Tween 20. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas 100µL do mix contendo 94µL de NFDm, 1µL de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidin) conjugada e 5µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas três vezes em Tween 20, durante cinco minutos cada. Em seguida, realizou-se a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, com banhos compostos por 5 minutos cada. Os cromossomos foram então contra-corados com DAPI (0,2µg/mL) diluído em uma solução “antifading” (Fluka).

4.5. Forma de análise dos resultados citogenéticos

As preparações cromossômicas obtidas pela citogenética clássica foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens dos cromossomos e as observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão. As preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software DP2-BSW, com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX51.

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi determinado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços e os acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço.

Os resultados obtidos com a citogenética clássica e molecular para cada uma das espécies analisadas foram comparados com os já disponíveis na literatura.

4.6. Metodologia Molecular

4.6.1. Extração de DNA

Foi adotado o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001). Inicialmente pequenos pedaços de tecido foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 700µL de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris-HCl 0,01M; Proteinase K – 100µg/mL e SDS 0,1%). As amostras foram então incubadas a 55°C por 2 horas. Foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o material foi agitado suavemente por 20 minutos. Centrifugou-se o material a 13.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. Foram acrescentados NaCl 1M e 2 volumes de etanol 100% gelado. O material foi agitado suavemente, posteriormente centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 200µL de álcool 70% gelado e centrifugou-se o material a 10.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Secou-se o DNA em estufa a 37°C e este foi resuspendido em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM). Acrescentou-se 1µl de RNase (concentração final = 100µg/mL).

Após a extração do DNA total, foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras, segundo recomendação do fabricante.

4.6.2. Amplificação do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI)

O gene mitocondrial da citocromo C oxidase subunidade I (COI) foi amplificado utilizando-se os primers FISH F1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e FISH R1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'), descritos por Ward et al. (2005).

As reações de PCR tiveram um volume final de 12,5µL, contendo: 1,25µL de 10X “PCR Buffer” (Invitrogen), 0,5µL de mix dNTPs (1,25 mM), 0,5µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de cada

primer (10mM), 0,2µL Taq polimerase (Invitrogen), 1,0 - 2,0µL (50ng) de DNA molde e água destilada estéril para completar os 12,5µL. As condições dos ciclos de PCR foram: 95°C/3 minutos; 35 ciclos de 95°C/30 segundos, 54°C/45 segundos, 68°C/1 minuto; com extensão final de 68°C/10 minutos.

4.6.3. Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR foram marcados em uma reação com BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (ABI), usando 3,90 µL de água ultrapura; 1,05 µL de tampão de sequenciamento 5X; 0,7 µL de Dye Terminator mix v3.1; 0,35 µL do primer (10 mM); e 1,0 µL do produto de PCR (50 ng/µL). As condições de termociclagem da reação consistiram em: 98°C/2 minutos e 35 ciclos de 98°C/45 segundos, 50°C/1 minuto, 60°C/4 minutos.

Os produtos marcados foram purificados por precipitação com EDTA/ acetato de sódio/ etanol, e então sequenciados bidirecionalmente em sequenciadores automáticos de DNA: ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), de 4 capilares, e ABI 3500 Genetic Analyzer, de 8 capilares.

4.6.4. Análise dos dados

Sequências de cinco indivíduos de cada espécie foram inicialmente analisadas com o software Bioedit 5.0.9 (Hall, 1999) e uma sequencia consenso foi obtida para cada exemplar analisado. Após isto, todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW integrado no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001). As distâncias genéticas foram estimadas com o modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). Os padrões de divergência sugeridos pelas distâncias intra e interespecíficas foram graficamente representados usando um dendrograma de Neighbour-Joining (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap*, feito no MEGA 5.01 (Tamura et al., 2011).

4.7. Referências

- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 2:103-120.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.
- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) species. **Cytogenetic and Genome Research**. 134:64-71.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. 36:1014-1015.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.

- Kimura, M. A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 16:111-120.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**. 87:1-6.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**. 44:903-910.
- Pineau, P.; Henry, M.; Suspène, R.; Marchio, A.; Dettai, A.; Debruyne, R.; Petit, T.; Lécu, A.; Moisson, P.; Dejean, A.; Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.P. (2005). A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**. 22:582-588.
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. Nova Iorque: Laboratory Press.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75:304-306.

- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**. 10:2731-2739.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 360:1847-1857.
- Xia, X.; Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. 92:371-373.

4.8. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies coletadas e informações dos pontos de coleta.

Espécie	N° exemplares	Localidade	Bacia hidrográfica	GPS	Depósito
<i>Apareiodon cavalcante</i>	54 ♂ e 15 ♀	rio Claro, Cavalcante (GO)	Tocantins- Araguaia	13°53'02,30" S 47°42'42,00" O	NUP 16232
<i>Apareiodon</i> sp. 1	10 ♂ e 9 ♀	rio Passa-Treizinho, Uruaçu (GO)	Tocantins- Araguaia	14°31'19,20" S 49°11'13,30" O	NUP 16230
<i>Apareiodon</i> sp. 2	8 ♂ e 11 ♀	rio Bandeirinha, Formosa (GO)	Tocantins- Araguaia	15°28'49,99" S 47°20'31,84" O	NUP 16192
<i>Apareiodon machrisi</i>	25 ♂ e 24 ♀	ribeirão Cristalino, Campinorte (GO)	Tocantins- Araguaia	13°43'14,38" S; 48°42'37,46" O	NUP 17079
<i>Apareiodon argenteus</i>	5 ♂ e 3 ♀	rio Araguaia, Aragarças (GO)	Tocantins- Araguaia	15°53'32,70" S 52°15'03,21"	NUP 16227
<i>Parodon cf. pongoensis</i>	11 ♂ e 8 ♀	rio Araguaia, Aragarças (GO)	Tocantins- Araguaia	15°53'32,70" S 52°15'03,21"	NUP 16228
<i>Apareiodon davisi</i>	21 ♂ e 32 ♀	rio Salgado, Icó (CE)	Jaguaribe	06°24'25,80" S 38°52'01,70" O	NUP 17080

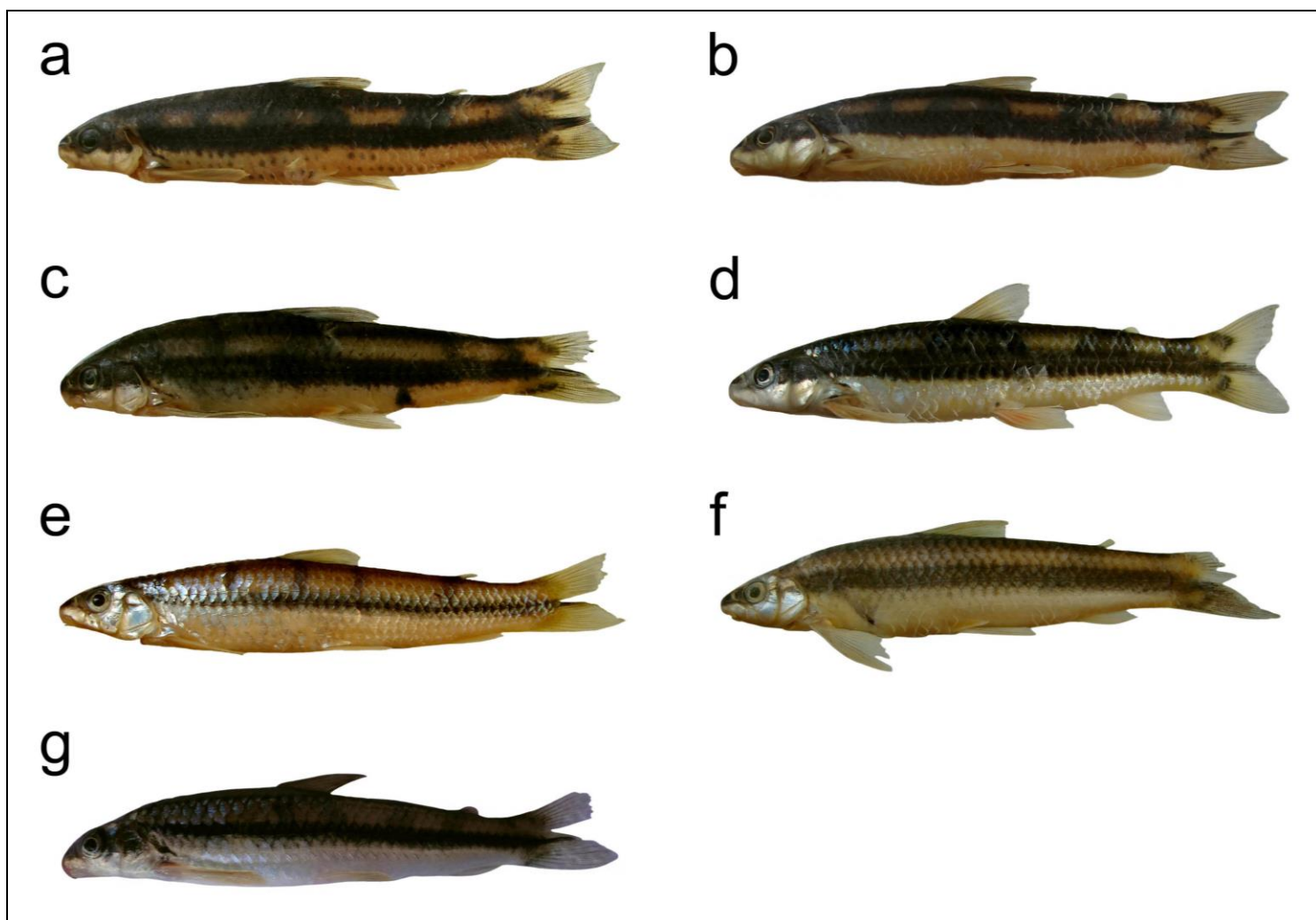


Figura 1. Fotos das espécies de Parodontidae coletadas, com suas respectivas medidas do comprimento padrão.

Exemplar de *Apareiodon cavalcante*, 63mm (a); *Apareiodon* sp.1, 65mm (b); *Apareiodon* sp. 2, 62mm (c);

Apareiodon machrisi, 72mm (d); *Apareiodon argenteus*, 90mm (e); *Parodon* cf. *pongoensis*, 67mm (f);

Apareiodon davisi, 72mm (g).

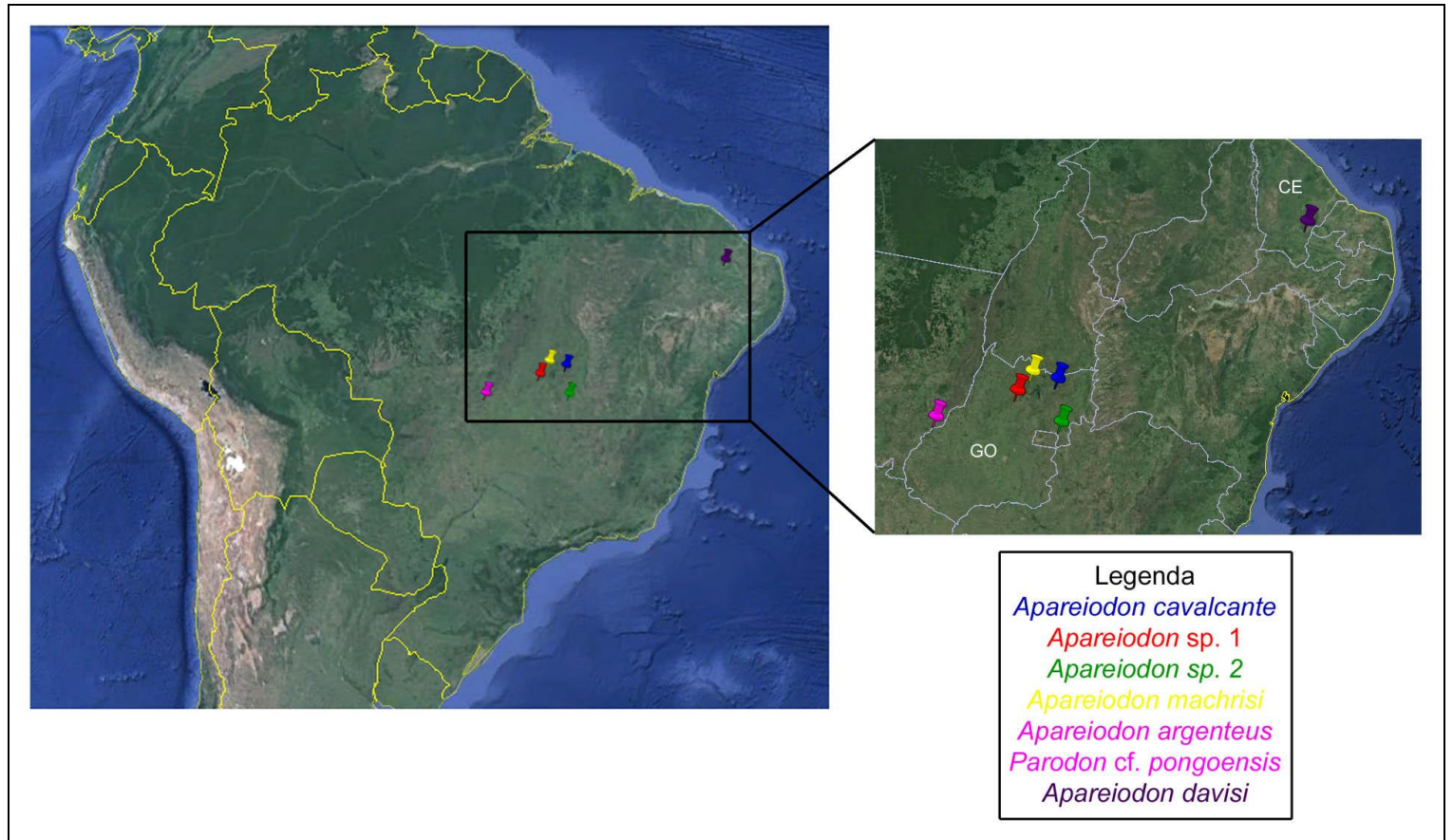


Figura 2. Mapa do Brasil com os pontos de coleta das espécies da família Parodontidae. Imagens extraídas do Google Earth.



Figura 4. Local de coleta de *Apareiodon* sp. 1 (rio Passa-Trezinho, Uruaçu - GO).



Figura 5. Local de coleta de *Apareiodon* sp. 2 (rio Bandeirinha, Formosa - GO).



Figura 6. Local de coleta de *Apareiodon machrisi* (ribeirão Cristalino, Campinorte - GO).



Figura 7. Local de coleta de *Apareiodon argenteus* e *Parodon* cf. *pongoensis* (rio Araguaia, Aragarças - GO).



Figura 8. Local de coleta de *Apareiodon davisi* (rio Salgado, Icó - CE).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de três capítulos, os quais se encontram elaborados no formato de artigos científicos:

CAPÍTULO 1:

Análises cromossômicas em *Apareiodon argenteus* e *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): um caso de polimorfismos cromossômicos dos DNAs ribossomais 45S e 5S.

CAPÍTULO 2:

Divergência evolutiva recente em peixes do gênero *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae): inferências cromossômicas e moleculares.

CAPÍTULO 3:

Mapeamento cromossômico das sequências de histonas H1 e H4 em espécies de Parodontidae (Characiformes).

**Análises cromossômicas em *Apareiodon argenteus* e
Apareiodon davisii (Characiformes, Parodontidae): um
caso de polimorfismos cromossômicos dos DNAs
ribossomais 45S e 5S.**

Resumo

No presente estudo foram analisadas duas espécies de *Apareiodon* ainda não estudadas até o momento pela citogenética clássica e molecular: *A. argenteus* e *A. davisi*. Ambas apresentaram 54 cromossomos metacêntricos/submetacêntricos, com blocos heterocromáticos alocados preferencialmente nas regiões centroméricas. As regiões organizadoras de nucléolo mostraram-se ativas no par cromossômico 2 em *A. argenteus*; e nos pares 4 e 9 em *A. davisi*. Os genes ribossomais 45S e 5S foram localizados, respectivamente, nos pares cromossômicos 2 e 18 em *A. argenteus*. Um caso de polimorfismo dessas sequências ribossomais foi verificado em *A. davisi*, ocorrendo variações em número/posição dos sítios, e co-localização destes genes em alguns pares cromossômicos. O DNA satélite pPh2004 foi observado nos pares cromossômicos 7, 8, 10, 11 e 18 em *A. argenteus* e no par 24 em *A. davisi*. A fração repetitiva WAp mostrou-se dispersa pelos cromossomos das duas espécies. De acordo com os dados obtidos, o presente estudo descreve o primeiro caso de polimorfismo cromossômico que envolve as duas sequências ribossomais em Parodontidae e discute o papel dos DNAs repetitivos na diversificação genômica e cariotípica desta família.

Palavras-chave: peixes, citogenética clássica, citogenética molecular, hibridização *in situ* fluorescente

Abstract

This study analyzed two *Apareiodon* species without available chromosome data: *A. argenteus* and *A. davisi*. Both species have 54 metacentric/submetacentric chromosomes, with centromeric blocks of heterochromatin. Nucleolus organizer regions were active in chromosome pair 2 in *A. argenteus* and pairs 4 and 9 in *A. davisi*. In *A. argenteus* 45S and 5S ribosomal genes were located in chromosome pairs 2 and 18, respectively. Polymorphisms were observed in these ribosomal sequences in *A. davisi*, with variations in the number/position of sites, and co-localization of these genes in some chromosome pairs. The satellite DNA pPh2004 was identified in chromosome pairs 7, 8, 10, 11 and 18 in *A. argenteus* and in pair 24 in *A. davisi*. The WAp repetitive fraction was dispersed along the chromosomes of the two species. The present study describes the first case of chromosomal polymorphisms involving two ribosomal sequences in Parodontidae and discusses the role of repetitive DNAs in the genome and karyotype diversity of this family.

Keywords: fish, classical cytogenetics, molecular cytogenetics, fluorescence *in situ* hybridization

5.1.1. Introdução

Parodontidae corresponde a uma família de peixes neotropicais com 32 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2015), distribuídas em três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Roberts, 1974). Estas espécies são encontradas na América do Sul e parte do Panamá (Pavanelli & Britski, 2003), habitando rios de água corrente e fundo rochoso, especialmente corredeiras e cachoeiras (Nakatani et al., 2001).

O grupo apresenta número diploide (2n) igual a 54 cromossomos, com variações nas fórmulas cariotípicas. A heterocromatina ocorre preferencialmente nas regiões centroméricas dos cromossomos, sendo encontrados também blocos terminais e intersticiais (Moreira-Filho et al., 1984; Jesus & Moreira-Filho 2000a, b; Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2006a; Vicari et al., 2010). Os sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ e ZZ/ZW são encontrados em algumas espécies (Moreira-Filho et al., 1980, 1993; Centofante et al., 2002; Vicari et al. 2006a; Rosa et al., 2006; Bellafronte et al., 2009; Bellafronte et al., 2011; Bellafronte et al., 2012).

Os genes ribossomais 45S e 5S exibem variação em número e localização entre as espécies de Parodontidae, sendo encontrados em condições simples e múltipla, além de ocorrer um caso de sintenia em *Parodon nasus* (Vicente et al., 2001; Bellafronte et al., 2005; Bellafronte et al., 2011). O DNA satélite pPh2004, isolado a partir de *Parodon hilarii* (Vicente et al., 2003), foi verificado nos cariótipos de *Apareiodon affinis*, *P. hilarii*, *Parodon moreirai*, *Parodon nasus* e *Parodon pongoensis*, não sendo observado nos cariótipos de *Apareiodon hasemani*, *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon piracicabae*, *Apareiodon vladii*, *Apareiodon* e *Apareiodon* sp. (Bellafronte et al., 2011). Já a fração repetitiva WAp, obtida a partir do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (rio Verde) (Schemberger et al., 2011), é verificada em todas as espécies que possuem dados citogenéticos disponíveis (Bellafronte et al., 2011; Bellafronte et al., 2012; Schemberger et al., 2011).

Em função de possuir um reduzido número de espécies, em relação a outros grupos de peixes neotropicais, e grande diversidade cariotípica, Parodontidae representa um interessante grupo para

estudos de evolução cromossômica. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da evolução cariotípica desta família, através de análises cromossômicas das espécies *A. argenteus* e *A. davisi*, as quais ainda não apresentavam informações citogenéticas.

5.1.2. Materiais e Métodos

Amostras e pontos de coleta

Foram analisados oito exemplares (5 machos e 3 fêmeas) de *A. argenteus* provenientes do rio Araguaia, cidade de Aragarças, estado de Goiás, Brasil (GPS: 15°53'32,70" S; 52°15'03,21" O) e 53 exemplares (21 machos e 32 fêmeas) de *A. davisi* provenientes do rio Salgado, cidade de Icó, estado do Ceará, Brasil (GPS: 06°24'25,80" S; 38°52'01,70" O). Todas as coletas foram realizadas com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1). Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética de Experimentação Animal (processo: 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), estado do Paraná, Brasil. Os espécimes foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil, e estão identificados pelos seguintes vouchers: *A. argenteus* - NUP 16227 e *A. davisi* - NUP 17080.

Preparações cromossômicas e análises de citogenética clássica

Suspensões celulares contendo os cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de porções do rim anterior dos animais, de acordo com protocolos descritos por Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). Para a definição dos números diploides e fórmulas cariotípicas, os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5%. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi determinado

considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como portadores de dois braços e os acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço. As regiões heterocromáticas foram evidenciadas através do procedimento de bandamento C descrito por Sumner (1972), com etapa final de coloração por iodeto de propídio (Lui et al., 2012). As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram identificadas através da técnica de impregnação por nitrato de prata descrita por Howell & Black (1980). As preparações cromossômicas clássicas foram analisadas em microscópio de campo claro.

Análises de citogenética molecular

Foi realizado o mapeamento físico de quatro sequências de DNAs repetitivos: rDNA 45S, rDNA 5S, DNA satélite pPh2004 e fração repetitiva WAp. Os DNAs ribossômicos 45S e 5S e o DNA satélite pPh2004 foram amplificados a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004), Martins & Galetti Jr. (2001) e Vicente et al. (2003), respectivamente. As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, sendo que as amplificações de rDNA 45S e pPh2004 foram marcadas com biotina 16-dUTP (Biotin Nick Translation mix, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), enquanto a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Dig Nick Translation mix, Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante.

A fração repetitiva WAp foi amplificada e marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) através de reações de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed - Polymerase Chain Reaction), a partir da microdissecção da porção heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (rio Verde) (Schemberger et al., 2011).

As hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) seguiram o protocolo de Pinkel et al. (1986), e foram realizadas sob condições de alta estringência (77%), com mix de hibridização composto por 200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano e 2xSSC. As lâminas foram submetidas à hibridização por 16 horas. A detecção dos sinais foi realizada utilizando avidina-FITC

(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para as sondas de rDNA 18S e pPh2004; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para as sondas de rDNA 5S e WAp.

As preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software DP2-BSW, com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX51.

5.1.3. Resultados

Os exemplares de *A. argenteus* exibiram $2n = 54$ cromossomos, sendo todos metacêntricos/submetacêntricos, com $NF = 108$ (Fig. 1a). As NORs ativas foram identificadas na região terminal do braço longo do par cromossômico 2 (Fig. 1a, em destaque). Blocos heterocromáticos foram observados preferencialmente em regiões centroméricas e terminais dos cromossomos, com blocos evidentes nos pares 2, 3, 4, 5, 15, 16, 18 e 20 (Fig. 1b).

Os exemplares de *A. davisi* apresentaram $2n = 54$ cromossomos, sendo todos metacêntricos/submetacêntricos, com $NF = 108$ (Fig. 1a). As NORs ativas foram identificadas na região terminal do braço longo dos pares cromossômicos 4 e 9 (Fig. 1c, em destaque). Blocos heterocromáticos foram observados preferencialmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos, com blocos evidentes nos pares 3, 5, 11, 12 e 20 (Fig. 1d).

Em *A. argenteus*, a sequência de rDNA 45S encontra-se alocada apenas na porção terminal do par cromossômico 2 (Fig. 2a). A sequência do rDNA 5S foi verificada em porção intersticial do braço curto do par cromossômico 18 (Fig. 2a). O DNA satélite pPh2004 foi verificado na porção terminal de ambos os braços cromossômicos nos pares 7, 8, 11 e 18, e na porção terminal do braço longo do par 10 (Fig. 2b). A fração repetitiva WAp mostrou-se presente em vários pares cromossômicos, com blocos preferencialmente alocados nas regiões terminais dos cromossomos (Fig. 2b).

Em *A. davisi*, a utilização da técnica de FISH com sondas de rDNAs 45S e 5S evidenciou múltiplos sítios dessas sequências (Fig. 2c). O DNA satélite pPh2004 foi encontrado na região terminal do braço longo do par cromossômico 24 (Fig. 2d). A fração repetitiva WAp mostrou-se dispersa pelos cromossomos, com blocos preferencialmente alocados em porções terminais (Fig. 2d).

Polimorfismos que envolvem as sequências ribossomais foram evidenciados em *A. davisi* (Fig. 3). Os pares cromossômicos 4, 9 e 14 exibiram variantes cromossômicas com blocos co-localizados dos rDNAs 45S e 5S na região terminal do braço longo, e variantes sem a presença das sequências ribossomais (Fig. 3). O par 5 exibiu variantes cromossômicas com um sítio de rDNA 45S em região terminal e dois sítios de rDNA 5S, e variantes cromossômicas não portadoras de sequências ribossomais (Fig. 3). Os pares 7 e 8 apresentou variantes com sítios terminais de rDNA 45S e variantes sem estes sítios (Fig. 3). O par cromossômico 17 apresentou variantes com um grande sítio de rDNA 5S em porção intersticial do braço curto e blocos dos rDNAs 45S e 5S co-localizados na região terminal do braço longo; variantes com dois sítios de rDNA 5S; e variantes com o maior sítio de rDNA 5S (Fig. 3). O par cromossômico 18 exibiu um sítio intersticial de rDNA 5S no braço longo e variantes cromossômicas sem este sítio (Fig. 3).

5.1.4. Discussão

Os exemplares de *A. argenteus* e *A. davisi* apresentaram $2n = 54$ cromossomos, semelhante ao identificado nas outras espécies de Parodontidae. Apenas as fêmeas de *A. affinis* possuem 55 cromossomos, em decorrência do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW_1W_2 presente nessa espécie (Moreira-Filho et al., 1980). Todos os cromossomos de *A. argenteus* e *A. davisi* são metacêntricos/submetacêntricos, assim como observado em *P. moreirai* cit. *Parodon* sp. (Centofante et al., 2002), *P. moreirai* (Schemberger et al., 2011) e *A. hasemani* (Bellafronte et al., 2012). Quase a totalidade das espécies de Parodontidae apresenta fórmulas cariotípicas compostas de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (Bellafronte et al., 2011); cromossomos subtelocêntricos, quando

presentes, variam de 1 - 3 pares. A exceção ocorre para populações de *A. affinis* do rio Cuiabá (Jesus & Moreira-Filho, 1999) e do baixo rio Paraná (Jorge & Moreira-Filho, 2000; Calgaro et al., 2004) que detêm variação de número de cromossomos acrocêntricos. Considerando a pequena variação na fórmula cariotípica, a diversidade cromossômica da família deve ser decorrente de inversões pericêntricas, e acúmulo e movimentação de DNAs repetitivos, assim como sugerem Bellafronte et al. (2011), Schemberger et al. (2014) e Ziemniczak et al. (2015).

Em Parodontidae, a heterocromatina constitui um bom marcador cromossômico para detecção do sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e diferenciação de cariótipos (Bellafronte et al., 2011). Os padrões heterocromáticos verificados em *A. argenteus* e *A. davisi* indicam a ausência de cromossomos sexuais diferenciados nas duas espécies. Estes resultados são similares aos encontrados para *A. piracicabae* (Jesus & Moreira-Filho, 2000a) e *A. vittatus* (Bellafronte et al., 2011), as quais não possuem cromossomos sexuais diferenciados. Entretanto, os blocos heterocromáticos exclusivos verificados em *A. argenteus* corroboram a hipótese de Bellafronte et al. (2011) e Schemberger et al. (2011) de que os DNAs repetitivos desempenham um importante papel na diferenciação cromossômica de Parodontidae. Foi constatada também a sobreposição entre sítios Ag-NORs positivos e blocos heterocromáticos para as duas espécies analisadas, assim como é descrito para outras espécies da família, como *A. affinis* (Jesus et al., 1999; Jorge & Moreira-Filho, 2004), *P. moreirai* cit. *Parodon* sp. (Centofante et al., 2002), *A. ibitiensis* (Bellafronte et al., 2009) e *A. hasemani* (Bellafronte et al., 2012). A condição de NORs simples observada em *A. argenteus* é compartilhada com a maioria das espécies da família que possuem dados citogenéticos disponíveis. Entretanto, assim como foi verificado em *A. davisi* (presente trabalho), NORs múltiplas também já foram evidenciadas em *A. ibitiensis* (Bellafronte et al., 2009).

Em *A. argenteus* (presente estudo), o rDNA 45S foi observado em um único par cromossômico, como verificado para *A. affinis*, *Apareiodon* sp., *A. piracicabae*, *A. vladii*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Bellafronte et al., 2011). Em *A. davisi* (presente

trabalho), *A. ibitiensis* e *A. vittatus* (Bellafronte et al., 2011), sítios adicionais foram identificados. O maior sítio de rDNA 45S verificado nas espécies portadoras de NORs múltiplas é provavelmente correspondente ao sítio de rDNA 45S verificado nas espécies com NORs simples. Considerando que os pares cromossômicos portadores deste sítio apresentam tamanho e morfologia diferentes entre as espécies de Parodontidae, é possível supor que eventos de inversões pericêntricas, translocações, duplicações e deleções levaram os surgimentos dessas alterações morfológicas.

Na maioria das espécies da família Parodontidae, o gene ribossomal 5S mostra-se alocado em apenas um único par cromossômico, assim como verificado para *A. argenteus* (presente trabalho). Apenas em *A. vladii* cit. *Apareiodon* sp. (Rosa et al., 2006) e *A. davisii* (presente trabalho) foram identificados sítios adicionais. Todas as espécies de Parodontidae possuem sítios intersticiais de rDNA 5S alocados no braço curto de um par cromossômico, sendo um par subtelocêntrico em *P. nasus* e um submetacêntrico nas demais espécies. Este sítio possivelmente corresponde ao sítio ancestral de rDNA 5S de Parodontidae, em função de apresentar condição conservada entre as espécies.

O caso de sobreposição de sequências ribossomais de *A. davisii* é o primeiro relato para a família. Em *P. nasus*, há relato de sintenia destes genes, sem a sobreposição de sítios (Bellafronte et al., 2005). Em espécies de peixes pertencentes a outros grupos, como espécies de Channichthyidae (Mazzei et al., 2004), *Pimelodus britskii* (Moraes-Neto et al., 2011), espécies de *Ancistrus* (Mariotto et al., 2011), *Isbrueckerichthys duseni* e *Parotocinclus maculicauda* (Ziemniczak et al., 2012), e espécies de *Hypostomus* (Traldi et al., 2013), a sobreposição destas sequências já foi observada. A sobreposição dos genes ribossomais em várias porções cromossômicas de *A. davisii* levanta o questionamento sobre a integridade e funcionalidade destas sequências. O arranjo das sequências ribossomais em cromossomos distintos é a condição mais frequente em peixes (Lui et al., 2009). De acordo com Martins & Galetti Jr. (1999), a condição separada desses genes é mais vantajosa que a

sintênica. Segundo Dover (1986), rearranjos desfavoráveis como conversões gênicas e crossing-overs desiguais podem ocorrer quando os genes estão em sintonia.

O polimorfismo envolvendo as duas sequências ribossomais em *A. davisi* é o primeiro caso descrito para Parodontidae. Em literatura, há casos de polimorfismo envolvendo apenas o rDNA 18S, como verificado em *A. piracicabae* - NOR (Moreira-Filho et al., 1984; Jesus & Moreira-Filho, 2000a), *A. affinis* - NOR (Jorge & Moreira-Filho, 2004), *A. ibitiensis* e *A. vittatus* (Bellafronte et al., 2011). Outros grupos de peixes como, *Oncorhynchus mykiss* (Porto-Foresti et al., 2004) e *Rineloricaria lima* (Rosa et al., 2012), também possuem relatos de polimorfismo cromossômico envolvendo os genes ribossomais.

O polimorfismo referente à presença/ausência de um pequeno sítio de rDNA 5S no par 17 de *A. davisi* parece ser decorrente de um evento de inversão pericêntrica. A ocorrência da inversão levou uma parte do sítio maior e conservado localizado próximo ao centrômero para a região sub-terminal do braço longo desse par. Em peixes, há outros casos nos quais se evidencia a participação de inversões na distribuição de genes ribossomais (Jorge & Moreira-Filho, 2004; Porto-Foresti et al., 2004; Vicari et al., 2006b; Mariotto et al., 2009). Já o polimorfismo associado aos sítios de rDNA 18S parece ser decorrente de eventos de transposição de DNA entre cromossomos não-homólogos devido ao arranjo cromossômico na intérfase meiótica e prófase, levando à distribuição equilocal de sítios, já que tais sítios apresentam distribuição preferencial nas porções terminais dos cromossomos (Schweizer & Loidl, 1987). Em peixes, esse evento de distribuição equilocal parece ter participado da evolução cromossômica de outros grupos, como em *Hypostomus* (Artoni & Bertollo, 1999).

Estudos de sequenciamento e análise dos rDNAs têm evidenciado a invasão de elementos transponíveis, principalmente em suas regiões espaçadoras, os quais contribuem para o espalhamento destas famílias gênicas em cópias funcionais ou pseudogenes nos genomas (Drouin & Moniz de Sá, 1995; Da Silva et al., 2011; Gornung, 2013; Rebordinos et al., 2013; Symonová et al., 2013). No caso específico do rDNA 5S, a fusão deste gene a partes de elementos transponíveis pode dar origem

a *short interspaced nuclear elements* (SINEs) derivados do rDNA 5S (Sumner 2003; Piskurek et al., 2009). Já foi proposto que a diversificação de sítios de rDNAs em número de cópias e localização nos cromossomos pode afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos (Symonová et al., 2013; Pucci et al., 2014). Assim, a diversificação das famílias gênicas dos rDNAs em *A. davisii* pode ter ocorrido com o envolvimento de elementos transponíveis.

A fração repetitiva WAp e o DNA satélite pPh2004 são elementos repetitivos descritos para espécies de Parodontidae e têm sido utilizados como importantes marcadores evolutivos neste grupo (Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2010). Assim como verificado para *A. argenteus* e *A. davisii* (presente trabalho), todas as espécies da família com dados de WAp disponíveis exibem tal sequência dispersa pelo cariótipo, ocorrendo acúmulos diferenciais naquelas com sistemas de cromossomos sexuais definidos (Schemberger et al., 2011). O DNA satélite pPh2004, até o momento, havia sido localizado nos cromossomos de espécies do gênero *Parodon* e em *A. affinis* (Centofante et al., 2002; Vicente et al., 2003; Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). Nas demais espécies do gênero *Apareiodon* com estudos cromossômicos não foram detectados sinais desta sequência através de FISH (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011; Bellafronte et al., 2012). Na presente análise, *A. argenteus* e *A. davisii* apresentaram sítios do DNA satélite pPh2004 em seus cariótipos, possibilitando inferir que a origem deste DNA satélite ocorreu antes da separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, e que algumas espécies de *Apareiodon* sofreram posterior eliminação deste DNA satélite. Partindo do pressuposto de origem comum para todos os sítios das espécies, a condição inicial para este DNA satélite seria a de apenas um sítio, como verificado em *P. pongoensis* (Schemberger et al., 2011) e *A. davisii* (presente trabalho). Todas as outras espécies que possuem sítios múltiplos apresentariam uma condição derivada.

Segundo a proposta de Schemberger et al. (2011), a associação dos DNAs repetitivos pPh2004 e WAp permite a identificação de proto-cromossomos sexuais nas espécies da família Parodontidae que não apresentam sistemas sexuais bem definidos. De acordo com tais autores, o

proto-cromossomo sexual em *P. pongoensis* e *P. nasus* corresponde ao par 13, que é portador de sítios dos dois DNAs satélites citados. Em *A. piracicabae* e *A. vittatus*, as quais não apresentam heteromorfismo de cromossomos sexuais, os proto-cromossomos sexuais não puderam ser identificados com o uso destas duas sondas (Schemberger et al., 2011). Nas espécies analisadas no presente trabalho, analisando a posição dos sítios de pPh2004 e WAp, é possível identificar possíveis cromossomos correspondentes ao par 13 citado por Schemberger et al. (2011), o par 10 em *A. argenteus* e o par 24 em *A. davisi*.

O presente estudo apresentou os primeiros dados cromossômicos de *A. argenteus* e *A. davisi*. Estes resultados contribuem para o conhecimento da diversidade cariotípica da família, como observado pela ocorrência do polimorfismo cromossômico dos genes ribossomais em *A. davisi*, além de contribuir para a compreensão do papel dos DNAs repetitivos na diversificação genômica e cariotípica do grupo.

5.1.5. Agradecimentos

Os autores são gratos à Prof. Dr. Carla Simone Pavanelli pela identificação taxonômica dos espécimes; ao ICM-Bio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença N°10538-1) pela autorização da coleta do material; aos técnicos Pedro Luís Gallo, Luiz Henrique da Silva e Antônio Donizete da Silva pelos esforços de coleta e suporte técnico. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

5.1.6. Referências

- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**. 106:209-214.
- Bellafronte, E.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**. 28:710-716.
- Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**. 75:2313-2325.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559-570.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Artoni, R.F.; Moreira Filho, O.; Vicari, M.R. (2012). Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**. 35(4):770-776.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.
- Calgaro, M.R.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Roncati, H.A. (2004). Karyology of *Apareiodon affinis* from Paraná River (Argentina). I. Chromosome Polymorphism. **Cytologia**. 69(4):475-479.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 55:139-150.

- Da Silva, M.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F. (2011). Physical Mapping of 5S in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**.134:303-307.
- Dover, G.A. (1986). Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**. 2:159-165.
- Drouin, G.; Moniz de Sá, M. (1994). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Molecular Biology and Evolution**.12:481-493.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2015). **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Parodontidae>. Acesso 28 de agosto de 2015.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49: 810-813.
- Gornung, E. (2013). Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: a review of research. **Cytogenetic and Genome Research**. 141:90-102.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. 36:1014-1015.
- Jesus, C.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (1999). Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica**. 105:63-67.
- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000a). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**. 65:397-402.

- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000b). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. 11:75-80.
- Jorge, L.C.; Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**. 109:267-273.
- Jorge, L.C.; Moreira-Filho, O. (2004). Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 57:203-207.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**. 40:552-559.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**. 87:1-6.
- Mariotto, S.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Centofante, L.; Miyazawa, C.S. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**. 7:595-600.
- Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**. 5:289-300.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.

- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**. 44:903-910.
- Mazzei, F.; Ghigliotti, L.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.-P.; Ozouf-Costaz, C.; Pisano, E. (2004). Chromosomal patterns of major and 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae). **Polar Biology**. 28:47-55.
- Moraes-Neto, A.; Silva, M.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Collares-Pereira, M.J.; Artoni, R.F. (2011). Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**. 9:97-105.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P. M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia** 33:83-91.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P. M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 26: 564-568.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**. 46:115-125.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). **Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM.
- Pavanelli, C.S.; Britski, H.A. (2003). *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia basin, with description of three new species. **Copeia**. 2:337-348.

- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Piskurek, O.; Nishihara, H.; Okada, N. (2009). The evolution of two partner LINE/SINE families and a RT full-length chromodomain-containing Ty3/Gypsy LTR element in the RT first reptilian genome of *Anolis carolinensis*. **Gene**. 441:111-118.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Gomes, E.A.; Tabata, Y.A.; Rigolino, M.G.; Foresti F. (2004). A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Genetics and Molecular Biology**. 27:51-54.
- 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. (2014). Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. **Biological Journal of the Linnean Society**. 111:541-553.
- Rebordinos, I.; Cross, A.; Merlo, L. (2013). High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**.141:103-113.
- Roberts, T.R. (1974). Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the Families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. 146:411-472.
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:1-11
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006). Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S DNAr genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**. 128:159-166.

- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.;
Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex
chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii:
Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.;
Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA
library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach
to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11(6):518-527.
- Schweizer, D.; Loidl, J. (1987). A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band
patterns. **Chromosomes Today**. 9:61-74.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
Experimental Cell Research. 75:304-306.
- Sumner, A.T. (2003). **Chromosomes: organization and function**. Nova Iorque:
BlackwellPublishing.
- Symonová, R.; Majtánová, S.; Sember, A.; Staaks, G.B.O.; Bohlen, J.; Freyhof, J.; Rábová, M.; Ráb,
P. (2013). Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid
speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA
multiplications. **BMC Evolutionary Biology**. 13:1-11.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; Artoni, R.F.;
Moreira-Filho, O. (2013). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae)
with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular
Research**. 12:463-471.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2006a). ZZ/ZW sex chromosome
system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae).
Cytogenetics and Genome Research. 114:163-168.

- Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F. (2006b). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**. 29:621-625.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:365-369.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Rosa, K.O.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Arton, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**. 79:1-10.
- Ziemniczak, K.; Traldi, J.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2015). In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 1:325-332.

5.1.7. Figuras e Tabelas

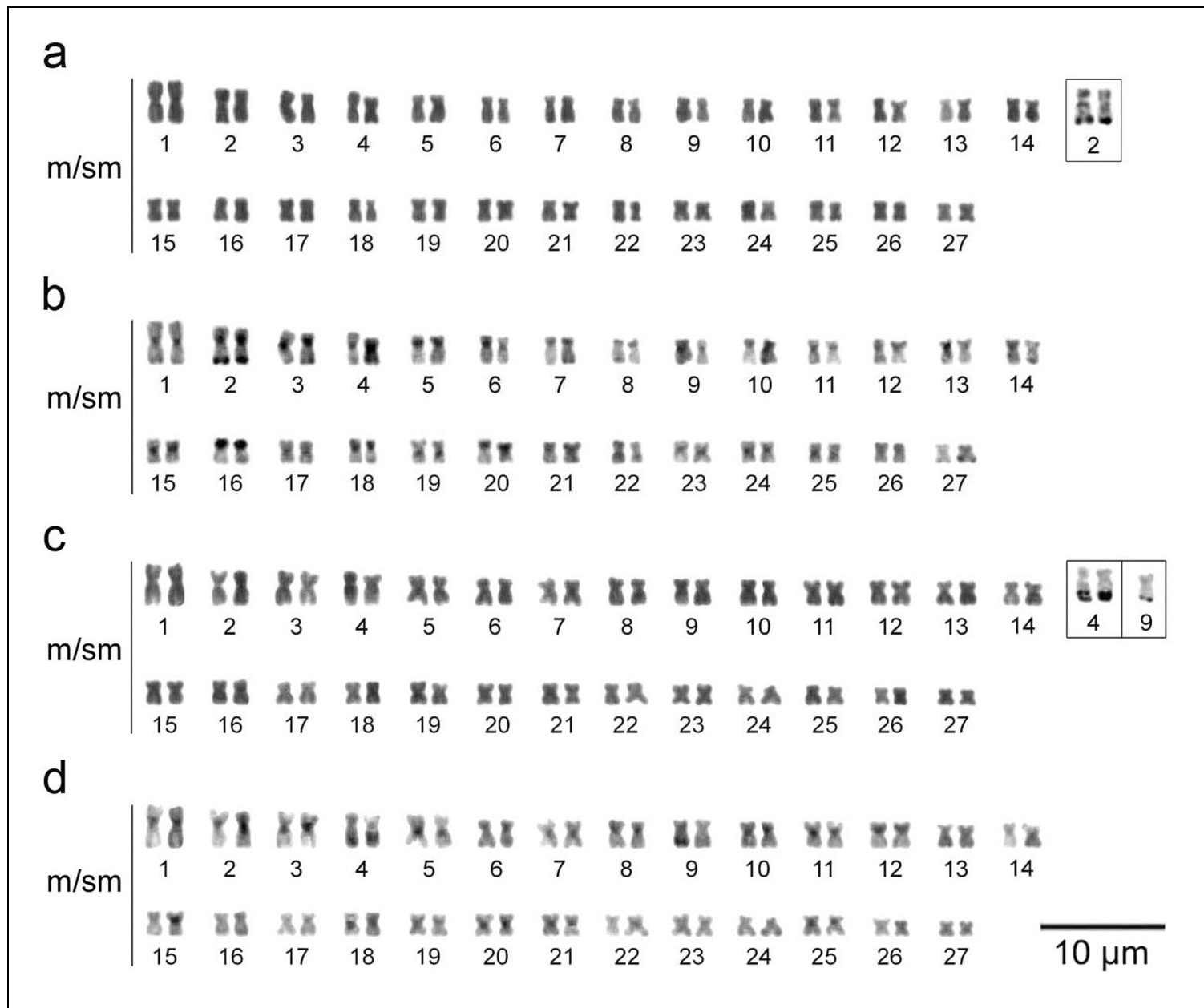


Figura 1. Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (a, b) e *Apareiodon davisi* (c, d) corados com Giemsa (a, c) e tratados pelo bandamento C (b, d). Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.

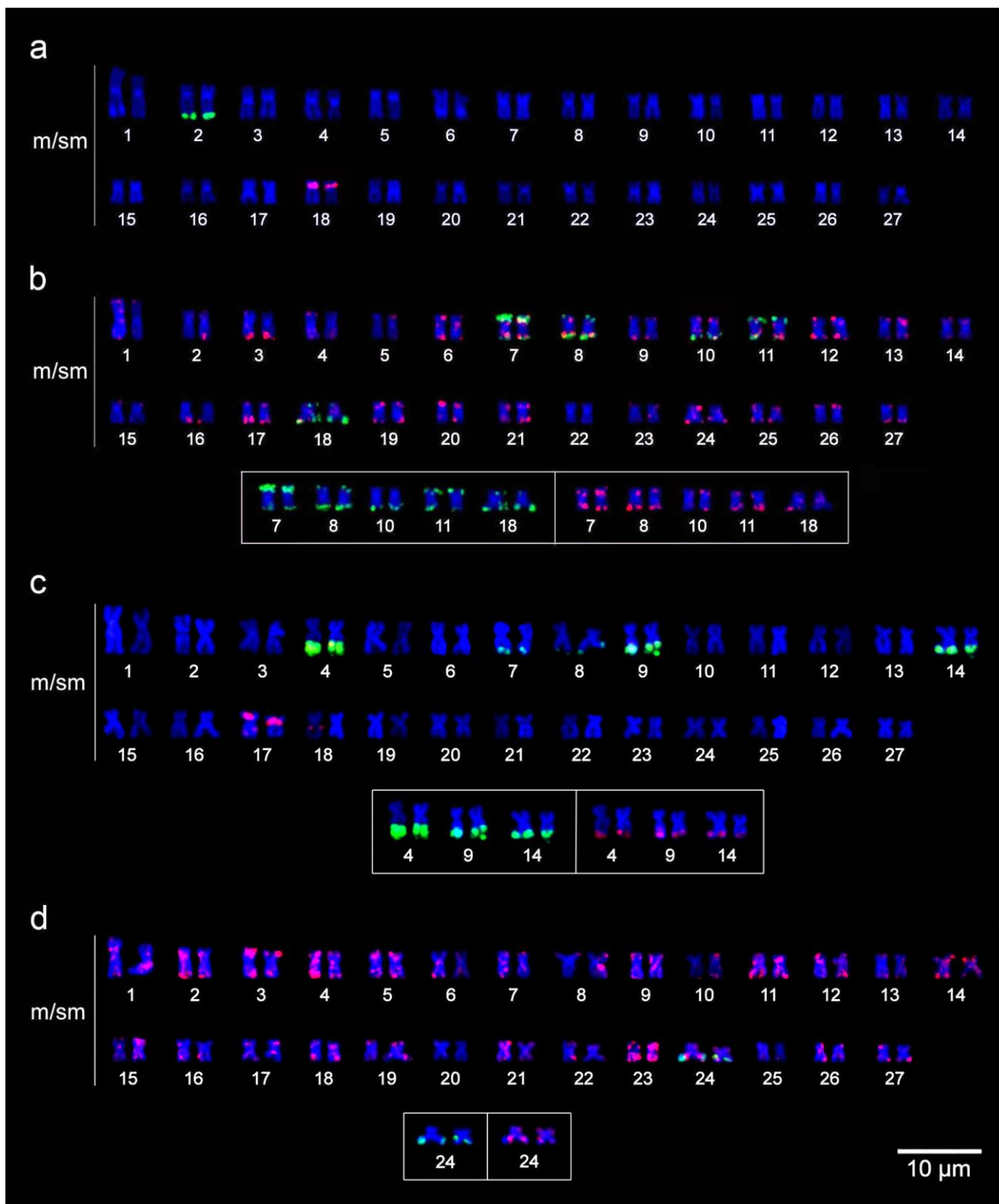


Figura 2. Cariótipos de *Apareiodon argenteus* (a, b) e *Apareiodon davisi* (c, d) submetidos a hibridizações *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho)

(a, c) e com sondas de pPh2004 (sinal verde) e WAp (sinal vermelho) (b, d). Em destaque, os cromossomos portadores de duas sondas.

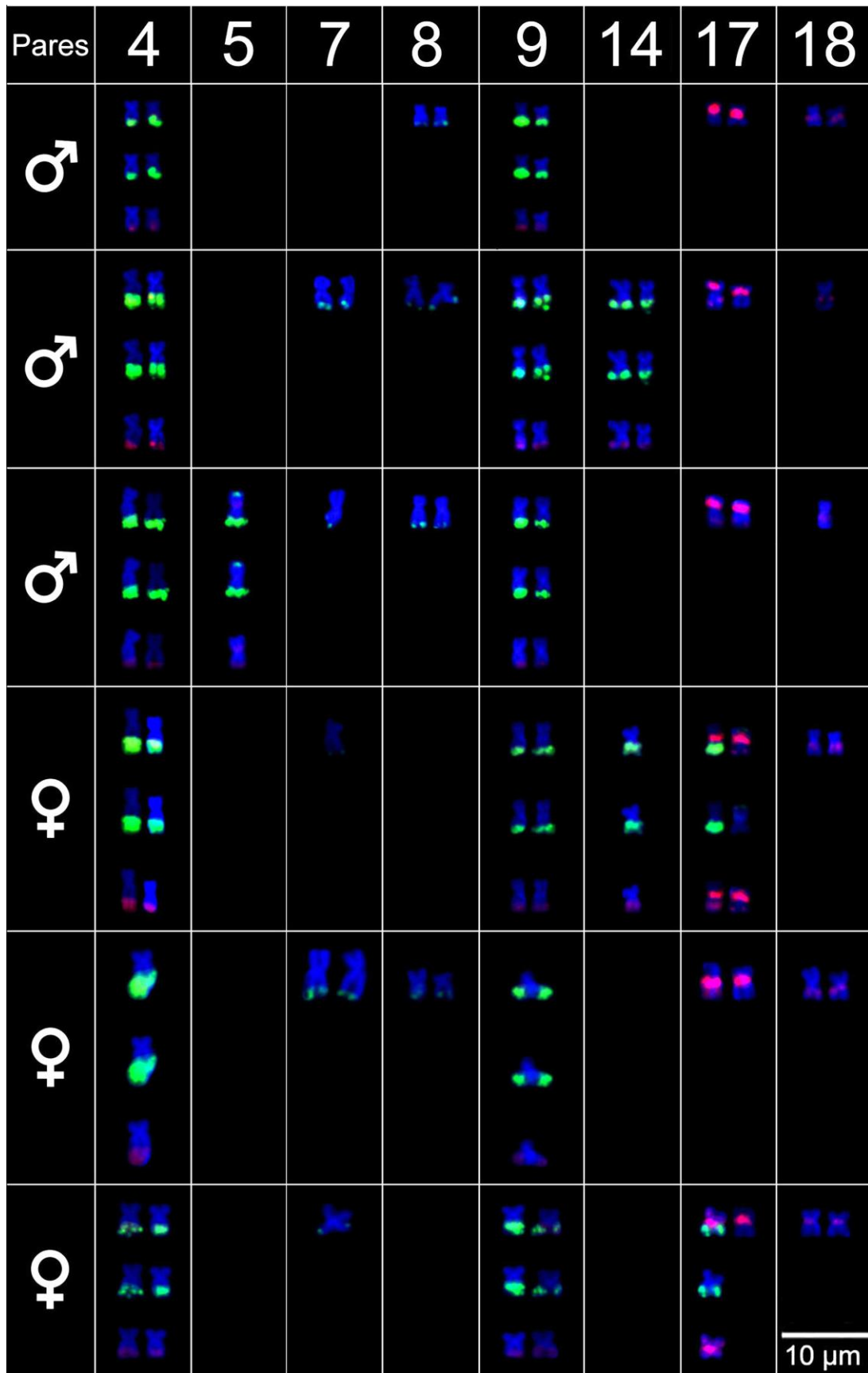


Figura 3. Polimorfismo de *Apareiodon davisi*. Pares cromossômicos portadores de polimorfismo dos genes ribossômicos 45S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho).

**Divergência evolutiva recente em peixes do gênero
Apareiodon (Characiformes, Parodontidae): inferências
cromossômicas e moleculares**

Resumo

Historicamente, a descrição das espécies de Parodontidae tem sido feita através da taxonomia morfológica. Com o avanço das técnicas citogenéticas e moleculares, a associação destes dados de diferentes naturezas tem produzido resultados robustos para a sistemática e taxonomia do grupo. Esta associação mostra uma tendência mundial em analisar populações naturais a partir de diferentes perspectivas. Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento da diversidade genética existente em Parodontidae, apresentando uma análise integrada de dados citogenéticos (clássicos e moleculares) e da sequência parcial do gene da citocromo C oxidase I (DNA Barcode) de quatro espécies de *Apareiodon* da bacia do rio Toncantins, Brasil: *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi*. Os resultados obtidos indicaram que os níveis cromossômico e molecular de organização biológica possuem taxas evolutivas distintas nessas espécies. Os marcadores utilizados indicam que estes quatro conjuntos de espécimes apresentam divergência recente, sendo *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi* espécies nominais. Portanto, *Apareiodon* sp. 2 representa uma possível espécie nova a ser descrita. Os exemplares de *Apareiodon* sp. 1, por sua vez, possivelmente constituem uma população de *A. machrisi* que reteve os caracteres cromossômicos ancestrais.

Palavras-chave: DNA Barcode, COI, citogenética clássica, citogenética molecular

Abstract

Historically, the description of Parodontidae species has been performed by morphological taxonomy. With the advancement of cytogenetic and molecular techniques, the combination of different data has produced solid results for systematic and taxonomy of the group. This association shows a global trend in analyzing natural populations from different perspectives. This paper aimed at contributing to the knowledge of the genetic diversity in Parodontidae, presenting an integrated analysis of cytogenetic data (classical and molecular) and partial sequence of the cytochrome C oxidase I gene (DNA Barcode) of four species of *Apareiodon* from Toncantins river basin, Brazil: *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 and *A. machrisi*. The obtained results indicated that the chromosomal and molecular levels of biological organization have distinct evolutionary rates in these species. The markers used indicate that these four sets of specimens show recent divergence, and *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 2 and *A. machrisi* are nominal species. Therefore, *Apareiodon* sp. 2 is a possible new species that needs to be described. The specimens of *Apareiodon* sp. 1 probably constitute a population of *A. machrisi* which retained chromosomal ancestral characters.

Keywords: DNA Barcode, COI, classical cytogenetics, molecular cytogenetics

5.2.1. Introdução

Parodontidae é uma família de peixes neotropicais da ordem Characiformes, composta por 32 espécies consideradas válidas (Eschmeyer & Fong, 2015). Do ponto de vista taxonômico, mostra-se distinta dos outros Characiformes por diversas características morfológicas, tais como ausência de lábio superior e presença de dentes pré-maxilares frouxamente ligados ao osso pré-maxilar através da face posterior de seu pedúnculo (Ingenito, 2008). Os três gêneros da família (*Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916) diferenciam-se entre si através do conjunto de duas características: número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais e ausência/presença de dentes na região latero-posterior da mandíbula (Pavanelli, 2003). Dentro do gênero *Apareiodon*, as 14 espécies válidas são discriminadas através de características como número de dentes pré-maxilares, número de dentes maxilares, número de cúspides dos dentes pré-maxilares e padrão de coloração externa (Pavanelli, 1999).

Apesar da grande importância dos caracteres morfológicos na identificação das espécies de Parodontidae, a associação destas informações com dados citogenéticos e moleculares tem produzido resultados robustos para a sistemática e taxonomia da família. Bellafronte et al. (2005), fazendo uso de estudos cromossômicos e análise do número de cúspides dos dentes pré-maxilares de *Parodon tortuosus* e *Parodon nasus*, confirmaram a proposta de Pavanelli (2003) em alocar *P. tortuosus* como sinônimo de *P. nasus*. Estudos de DNA Barcode associados a dados citogenéticos e morfológicos levaram Bellafronte et al. (2013) a identificar com maior acuracidade a possível existência de 2 grupos distintos dentro de *Apareiodon affinis*, indivíduos estes considerados morfológicamente semelhantes porém citogeneticamente distintos. Além disso, permitiu aos autores separar as espécies *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon* sp., as quais possuem marcadores citogenéticos semelhantes e morfologia levemente diferenciada.

A citogenética e a genética molecular não substituem as análises taxonômicas convencionais, mas são capazes de revelar casos nos quais existe divergência entre agrupados de uma unidade

biológica, e também participar na confirmação de táxons. Neste contexto, o presente trabalho busca contribuir para o conhecimento da diversidade genética existente em Parodontidae, apresentando uma análise integrada de dados citogenéticos (clássicos e moleculares) e da sequência parcial do gene da citocromo C oxidase I (COI) de quatro espécies de *Apareiodon* da bacia do rio Tocantins, Brasil.

5.2.2. Materiais e Métodos

Amostras e pontos de coleta

Foram analisados exemplares de quatro espécies de *Apareiodon*: *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi*, coletadas em quatro distintas localidades do estado de Goiás (Brasil), pertencentes à bacia do rio Tocantins (Tab. 1; Fig. 1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1). Os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo: 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Brasil. Todos os exemplares estão depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (NUPÉLIA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil (Tab. 1).

Metodologias de citogenética

Suspensões celulares contendo os cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de porções do rim anterior dos animais, de acordo com protocolos descritos por Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). Para a definição dos números diploides e fórmulas cariotípicas, os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5%. A classificação de Levan et al. (1964) foi utilizada para a determinação da fórmula cariotípica. As regiões heterocromáticas foram evidenciadas através do procedimento de bandamento C descrito por Sumner (1972), com etapa final de coloração por iodeto

de propídio (Lui et al., 2012). As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram identificadas através da técnica de impregnação por nitrato de prata descrita por Howell & Black (1980).

Foi realizado o mapeamento físico cromossômico por FISH (Fluorecence *in situ* Hybridization) de 6 famílias de DNAs repetitivos: rDNA 18S, rDNA 5S, sequência telomérica (TTAGGG)_n, sequência (GATA)_n, DNA satélite pPh2004 e fração repetitiva WAp.

Os DNAs ribossômicos 18S e 5S e o DNA satélite pPh2004 foram amplificados a partir de clones descritos por Hatanaka & Galetti Jr. (2004), Martins & Galetti Jr. (2001) e Vicente et al. (2003), respectivamente. O DNA telomérico (TTAGGG)_n foi amplificado utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al., 1991) e a sequência (GATA)_n foi obtida com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Eppelen et al., 1982).

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, sendo que as ampliações de rDNA 18S, (TTAGGG)_n, (GATA)_n e pPh2004 foram marcadas com biotina 16-dUTP (Biotin Nick Translation mix, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), enquanto a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Dig Nick Translation mix, Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante.

A fração repetitiva WAp foi amplificada e marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) através de reações de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed - Polymerase Chain Reaction), a partir de microdissecção da porção heterocromática do cromossomo W (Schemberger et al., 2011).

As hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) seguiram o protocolo de Pinkel et al. (1986), e foram realizadas sob condições de alta estrigência (77%), com mix de hibridização composto por 200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano e 2xSSC. As lâminas foram submetidas à hibridização por 16h. A detecção dos sinais foi realizada utilizando avidina-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para as sondas de rDNA 18S, (TTAGGG)_n, (GATA)_n e pPh2004; e anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) para as sondas de rDNA 5S e WAp.

As preparações cromossômicas obtidas pela citogenética clássica foram analisadas em microscópio óptico de campo claro e as preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software DP2-BSW, com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX51.

Metodologias moleculares

Foi realizada extração de DNA genômico a partir de porções do fígado, armazenados em etanol 100%, segundo protocolo de Sambrook et al. (2001). Sequências parciais do gene da citocromo C oxidase subunidade I (COI) foram obtidas conforme protocolo descrito por Bellafronte et al. (2013), utilizando-se os primers Fish F1 e Fish R1 (Ward et al., 2005).

As reações de sequenciamento foram realizadas usando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI) e os produtos foram então sequenciados bidirecionalmente em sequenciadores automáticos de DNA: ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

As sequências de cinco indivíduos de cada uma das quatro espécies estudadas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999). Todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW integrado no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001). As distâncias genéticas foram estimadas com o modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). O dendograma de Neighbour-Joining (NJ) e as análises de distância genética foram realizados através do programa MEGA 5.01 (Tamura et al., 2011). A rede de haplótipos foi construída através do programa DnaSP 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

5.2.3. Resultados

Dados citogenéticos

As quatro espécies analisadas possuem macroestrutura cariotípica conservada com $2n = 54$ cromossomos ($52m/sm + 2st$; $NF = 108$), sem a ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 2a, b, c, d). A heterocromatina ocupa preferencialmente as porções centroméricas e terminais de todos os cromossomos (Fig. 3a, b, c, d), enquanto que as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs) ocorrem na porção terminal do braço longo do par cromossômico 12 (Fig. 3a, b, c, d, em destaque).

Em *A. cavalcante* e *Apareiodon* sp. 1, as FISHs com sondas de rDNAs 18S e 5S evidenciaram a ocorrência de co-localização destas sequências em porções intersticiais dos pares cromossômicos 10 e 11 (Fig. 4a, b). Foi localizado também um sítio de rDNA 18S na região terminal do par 12 (Fig. 4a, b). Em *Apareiodon* sp. 2, a FISH com sonda de rDNA 18S revelou a ocorrência desta sequência em porção terminal do par 12 (Fig. 4c). Já para a sonda de rDNA 5S foram evidenciadas marcas intersticiais nos pares 5 e 11 (Fig. 4c). Em *A. machrisi*, a FISH sonda de rDNA 18S revelou sítios apenas na porção terminal do par 12 (Fig. 4d). Já a FISH com sonda de rDNA 5S revelou que esta sequência ocorre em porção intersticial do pares 10 e 11, e em co-localização com o rDNA 18S no par cromossômico 12 (Fig. 4d).

A sonda telomérica $(TTAGGG)_n$ mostrou-se presente nas regiões terminais de todos os cromossomos do cariótipo das quatro espécies, não sendo encontrados vestígios de sítios teloméricos intersticiais (ITS) (Fig. 5a, b, c, d). Os sítios da sonda $(GATA)_n$ mostraram-se distribuídos por todo o cariótipo das quatro espécies, concentrando-se preferencialmente nas porções terminais dos cromossomos em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1 e *Apareiodon* sp. 2 (Fig. 6a, b, c) e em porções intersticiais em *A. machrisi* (Fig. 6d). Foram observadas variações na intensidade destes sítios entre as espécies (Fig. 6a, b, c, d).

O DNA satélite pPh2004 foi localizado em porção intersticial do par cromossômico 1 e em duas porções do par cromossômico 23 em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1 e *Apareiodon* sp. 2, enquanto que a fração repetitiva WAp mostrou-se dispersa por todo o cariótipo dessas espécies,

sendo evidenciados acúmulos nas porções terminais dos cromossomos (Fig. 7a, b, c). Um sítio intersticial WAp adicional no par 23 foi verificado apenas em *Apareiodon* sp. 2 (Fig. 7c). Em *A. machrisi*, o DNA satélite pPh2004 mostrou-se presente apenas na região terminal do braço longo do par cromossômico 2, enquanto que a fração repetitiva WAp encontra-se dispersa pelo cariótipo, com blocos proeminentes nas regiões terminais e intersticiais dos cromossomos (Fig. 7d).

Dados moleculares

Para as quatro espécies analisadas no presente trabalho foram obtidas sequências do gene COI com 659 pares de bases. Todas as sequências obtidas foram de alta qualidade e não apresentaram evidências de inserções, deleções e códons de terminação. Estas sequências foram depositadas no GenBank. As distâncias genéticas variaram de $0,0011 \pm 0,0006$, entre indivíduos de *A. machrisi*, a $0,0452 \pm 0,0083$, entre indivíduos de *A. cavalcante* e *Apareiodon* sp. 2. (Tab. 2). A árvore de Neighbour-Joining obtida está representada na Fig. 8.

Para estas sequências foram identificados nove haplótipos, com diversidade haplotípica de 0,8667. Os haplótipos 1, 2 e 3 (H1, H2 e H3) mostraram-se compostos por indivíduos de *Apareiodon* sp. 2; os haplótipos 4 e 5 (H4 e H5) mostraram-se compostos por indivíduos de *A. cavalcante*; o haplótipo 6 (H6) mostrou-se composto por indivíduos de *A. machrisi* e *Apareiodon* sp. 1; e os haplótipos 7, 8 e 9 (H7, H8 e H9) mostraram-se compostos por indivíduos de *Apareiodon* sp. 1 (Fig. 9). A rede de haplótipos gerada para estas sequências encontra-se unida por um haplótipo ancestral hipotético (Fig. 9).

5.2.4. Discussão

Apesar das quatro espécies aqui estudadas compartilharem uma macroestrutura cariotípica conservada, exclusividades evolutivas podem ser destacadas para cada uma delas em relação à localização dos rDNAs 18S e 5S, concentração da sequência $(GATA)_n$, localização do DNA satélite

pPh2004 e dispersão da fração repetitiva WAp. Neste contexto, os pares cromossômicos 1, 2, 5, 10, 11, 12 e 23, juntamente com o padrão de dispersão das sequências (GATA)_n e WAp pelo cariótipo todo, são capazes de delimitar as espécies (Fig. 8). Com base nestes caracteres, pode ser sugerida a ocorrência de três espécies: (1) *A. cavalcante* se diferencia das demais pela co-localização dos genes ribossomais nos pares 10 e 11 e pelo padrão da sequência (GATA)_n com proeminentes blocos terminais; (2) *Apareiodon* sp. 2 pode ser distinguida das demais pelo sítio de rDNA 5S localizado no par 5, pela pequena quantidade de (GATA)_n no cariótipo, com blocos preferencialmente terminais, e pelo sítio de WAp co-localizado ao pPh2004 no par 23; e (3) *A. machrisi* mostra-se diferenciada pelo sítio de rDNA 5S co-localizado ao rDNA 18S no par 12, pelo padrão de dispersão da sequência (GATA)_n com poucos blocos terminais, pela grande quantidade da fração repetitiva WAp dispersa por todo o comprimento dos cromossomos e pela localização dos sítios de pPh2004 no par 2. Neste contexto, *Apareiodon* sp. 1 não pôde ser diferenciada de *A. cavalcante*, já que estas espécies compartilham os caracteres cromossômicos empregados.

Análises das sequências parciais do gene COI para *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi* evidenciaram uma distância genética intraespecífica média de 0,31%-0,10%. As distâncias genéticas interespecíficas para estas espécies apresentaram duas condições divergentes: (1) entre *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1 e *A. machrisi* os valores foram inferiores a 2%, com média de 0,84% - 0,36%; e (2) entre *Apareiodon* sp. 2 e as demais espécies os valores foram superiores a 2%, com média de 5,29% - 3,65%. Apesar da pequena diferença nos valores das distâncias genéticas intra e interespecíficas para *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1 e *A. machrisi*, *A. cavalcante* pôde ser diferenciada das demais, já que é composta por haplótipos exclusivos (Fig. 8). De acordo com Ward et al. (2009), o valor de 2% para diferenciação interespecífica pode ser usado como um ponto de início para a investigação, e, segundo Pereira et al. (2013) essa diferenciação deve ser considerada juntamente a outras características, como a história evolutiva das espécies. Neste contexto, os resultados moleculares indicam a formação de três grupos: (1) um grupo formado pelos

indivíduos de *A. machrisi* e *Apareiodon* sp.1; (2) um grupo formado pelos indivíduos de *A. cavalcante*; e (3) um grupo formado pelos exemplares de *Apareiodon* sp. 2.

Considerando a proximidade evidenciada pelos dados cromossômicos e moleculares, e o fato de estarem alocadas na mesma bacia hidrográfica, supõe-se que a divergência destas espécies é recente e, no passado, o fluxo gênico as mantinha homogêneas. Os afluentes da bacia do Alto rio Tocantins são caracterizados pela ocorrência de grandes cachoeiras. Desta forma, o surgimento destas barreiras pode ter levado ao isolamento das espécies, impedindo o fluxo gênico e favorecendo os processos vicariantes. Outras explicações plausíveis para o isolamento recente destas espécies podem ser as mudanças de seu comportamento dirigidas por pressão de predação e competição por alimento. De acordo com Lowe-McConnel (1999), a pressão de predação e a competição por alimento podem reduzir a dispersão das espécies limitando seu fluxo gênico e, desta forma, contribuir para formação de isolados populacionais e diferenciação de espécies.

A associação das informações cromossômicas e moleculares de *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi* evidencia que a evolução para estes dois níveis de organização biológica vêm ocorrendo em velocidades distintas nas espécies. Partindo do pressuposto que as quatro espécies compartilhem um ancestral comum, a sobreposição dos dados citogenéticos de *A. cavalcante* e *Apareiodon* sp. 1 é um forte indício de que a condição cromossômica destes exemplares corresponda a condição ancestral para o grupo. Neste sentido, a diferenciação de *A. cavalcante* ocorreu especialmente a nível molecular. Para *Apareiodon* sp. 2, a diferenciação das outras espécies analisadas ocorreu tanto em nível molecular quanto cromossômico, a caracterizando assim, como possível espécie nova. Para o grupo formado por *A. machrisi* e *Apareiodon* sp. 1, observou-se a ocorrência de diferenciação molecular em relação as demais espécies, acompanhada de diversificação cromossômica apenas em *A. machrisi*. Para este grupo, provavelmente, os dois conjuntos de exemplares representem distintas populações de *A. machrisi*, sendo que em uma delas ocorreu uma rápida evolução cromossômica.

Em outros parodontídeos e diferentes grupos de peixes também é possível observar que caracteres morfológicos, cromossômicos e moleculares vêm sofrendo diferentes taxas evolutivas. O par de espécies *Parodon nasus* e *Parodon moreirai* apresenta uma baixa divergência genética, contudo informações cromossômicas e morfológicas as diferenciam facilmente (revisado em Bellafronte et al., 2013). Para diferentes populações de *Apareiodon affinis*, a ausência de diferenças morfológicas associada a variações cromossômicas e alta divergência genética sugerem que o grupo seja um complexo de espécies (revisado em Bellafronte et al., 2013), assim como verificado para *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al., 2000) e *Astyanax fasciatus* (Pazza et al., 2006; Pazza & Kavalco, 2007). Em espécies das famílias Serranidae e Haemulidae, os caracteres cromossômicos não acompanharam a diversificação morfológica (Molina et al., 2002; Motta-Neto et al., 2011). De acordo com Mank & Avise (2006), os actinoptérgeos de maneira geral possuem um ultraconservadorismo no número cromossômico que se contrasta dramaticamente com o dinamismo evolutivo de suas sequências genômicas.

Com o intuito de contribuir para o conhecimento da diversidade genética existente na família Parodontidae, foram analisadas quatro espécies do gênero *Apareiodon* com dados cromossômicos e de DNA Barcode inexistentes até o presente momento. Os resultados obtidos indicaram que estes dois níveis de organização biológica (cromossômico e molecular) possuem taxas evolutivas distintas nessas espécies, assim como ocorre para outras espécies de peixes. Os marcadores utilizados indicam que estes quatro conjuntos de espécimes apresentam divergência recente, sendo *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi* espécies nominais. Portanto, *Apareiodon* sp. 2 representa uma possível espécie nova a ser descrita. Os exemplares de *Apareiodon* sp. 1, por sua vez, possivelmente constituem uma população de *A. machrisi* que reteve os caracteres cromossômicos ancestrais.

5.2.5. Agradecimentos

Os autores são gratos à Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli pela identificação taxonômica dos espécimes; ao ICM-Bio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença N°10538-1) pela autorização da coleta do material; aos técnicos Pedro Luís Gallo, Luiz Henrique da Silva e Antônio Donizete da Silva pelos esforços de coleta e suporte técnico, e à doutoranda Luz Eneida Rocha pelo apoio em laboratório. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

5.2.6. Referências

- Bellafronte, E.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**. 28:710-716.
- Bellafronte, E.; Mariguela, T.C; Pereira, L.H.G; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**. 11(3):497-506.
- Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**. 8:603-613
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.

- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2015). **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Parodontidae>. Acesso agosto de 2015.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. **Experientia**. 49: 810-813.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. 36:1014-1015.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.
- Ingenito, L.F.S. (2008). **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes)**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.
- Kimura, M. A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 16:111-120.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.

- Librado, P.; Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. 25:1451-1452.
- Lowe-McConnel, R.H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2012). Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**. 87:1-6.
- Mank, J.E.; Avise, J.C. (2006). Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. **Genetica**. 127:321-327.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**. 44:903-910.
- Molina, W.F.; Maia-Lima, F.A.; Affonso, P.R.A.M. (2002). Divergence between karyotypical pattern and speciation events in Serranidae fish (Perciformes). **Caryologia**. 55(4):299-305.
- Motta-Netto, C.C.; Ciofii, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2011). Molecular cytogenetic analysis of Haemulidae fish (Perciformes): Evidence of evolutionary conservation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 407:97-100.
- Pavanelli, C.S. (1999). **Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Pavanelli, C.S. (2003). Family Parodontidae (Parodonts). In: Check List of the Freshwaters of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) I. Karyotype analysis, Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**. 112:313-319

- Pazza, R.; Kavalco, K.F. (2007). Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The nucleus**. 50:519-543.
- Pereira, L.H; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**. 14:20
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. Nova Iorque: Laboratory Press.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75:304-306.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**. 10:2731-2739.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R., Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 360:1847-1857.
- Ward, R.D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**. 9:1077-1085.

Xia, X; Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. 92:371-373.

5.2.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Informações das espécies coletadas.

Espécie	Exemplares	Localidade	GPS	Depósito
<i>Apareiodon cavalcante</i>	54 ♂ e 15 ♀	rio Claro, cidade de Cavalcante	13°53'02,30" S; 47°42'42,00" O	NUP 16232
<i>Apareiodon</i> sp. 1	10 ♂ e 9 ♀	rio Passa-Trezinho, cidade de Uruaçu	14°31'19,20" S; 49°11'13,30" O	NUP 16230
<i>Apareiodon</i> sp. 2	8 ♂ e 11 ♀	rio Bandeirinha, cidade de Formosa	15°28'49,99" S; 47°20'31,84" O	NUP 16192
<i>Apareiodon machrisi</i>	25 ♂ e 24 ♀	ribeirão Cristalino, divisa entre as cidades de Campinorte e Campinaçu	13°43'14,38" S; 48°42'37,46" O	NUP 17079

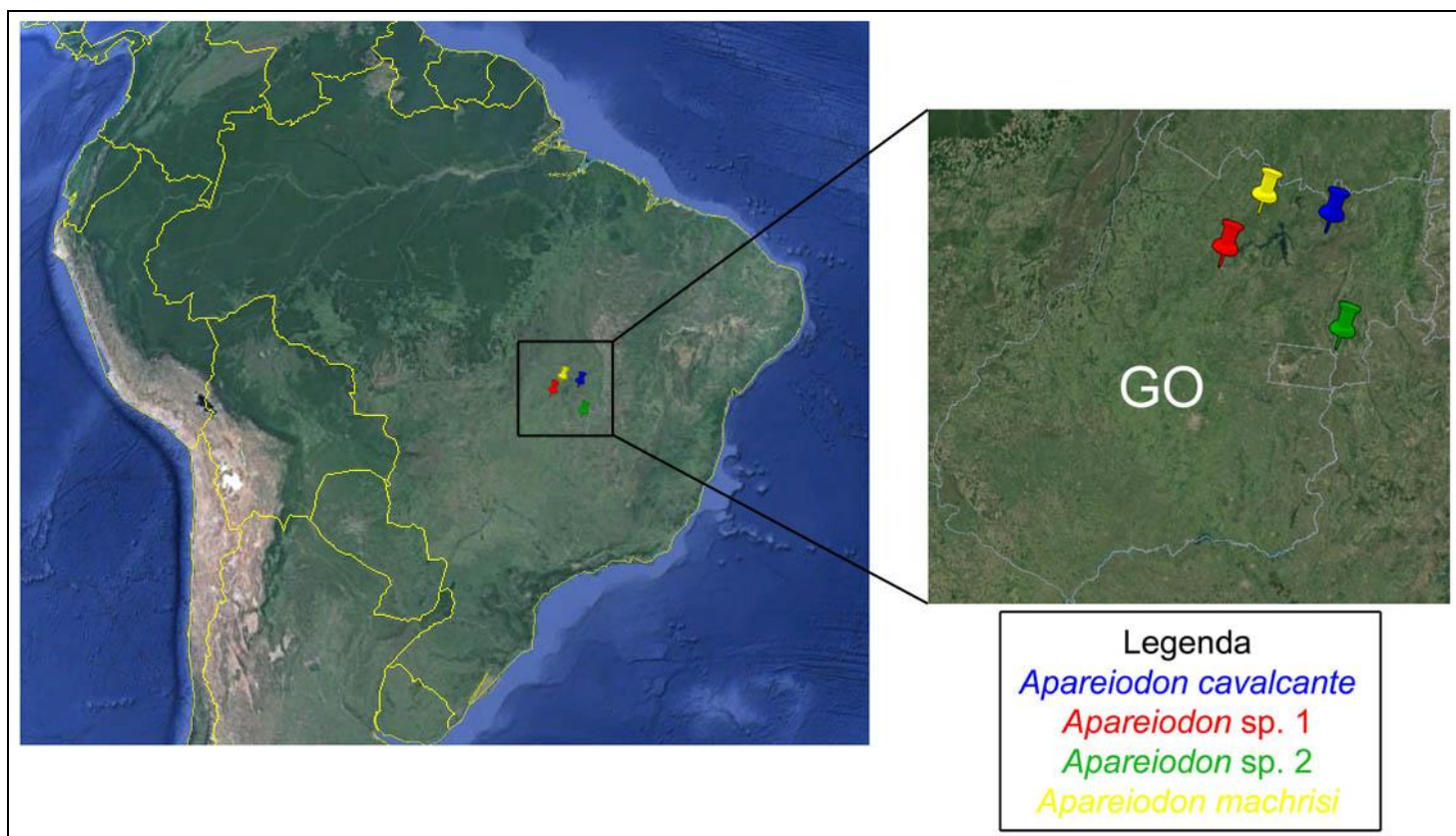


Figura 1. Figura representativa da área de coleta. Imagens extraídas do Google Earth.

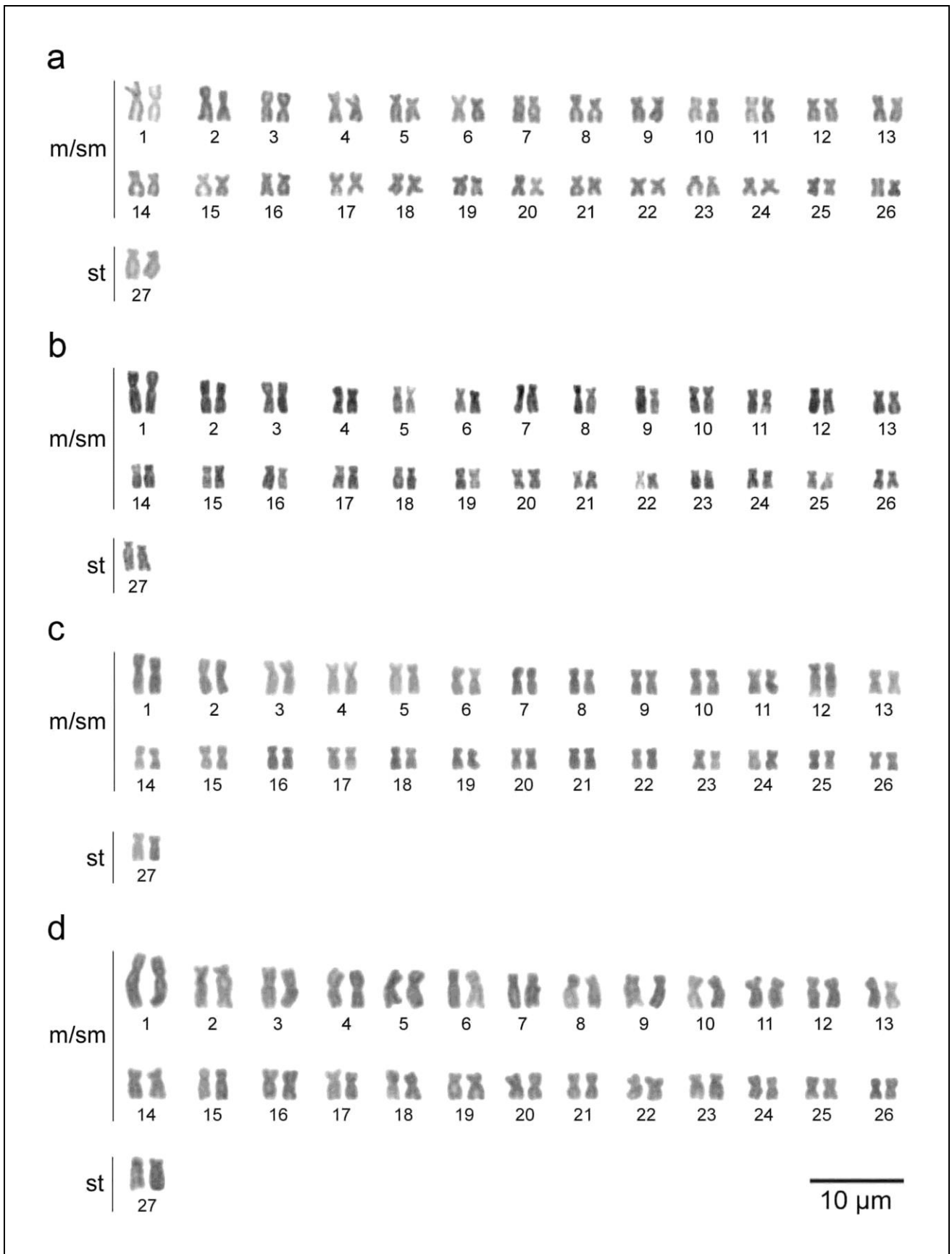


Figura 2. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) com coloração convencional com Giemsa.

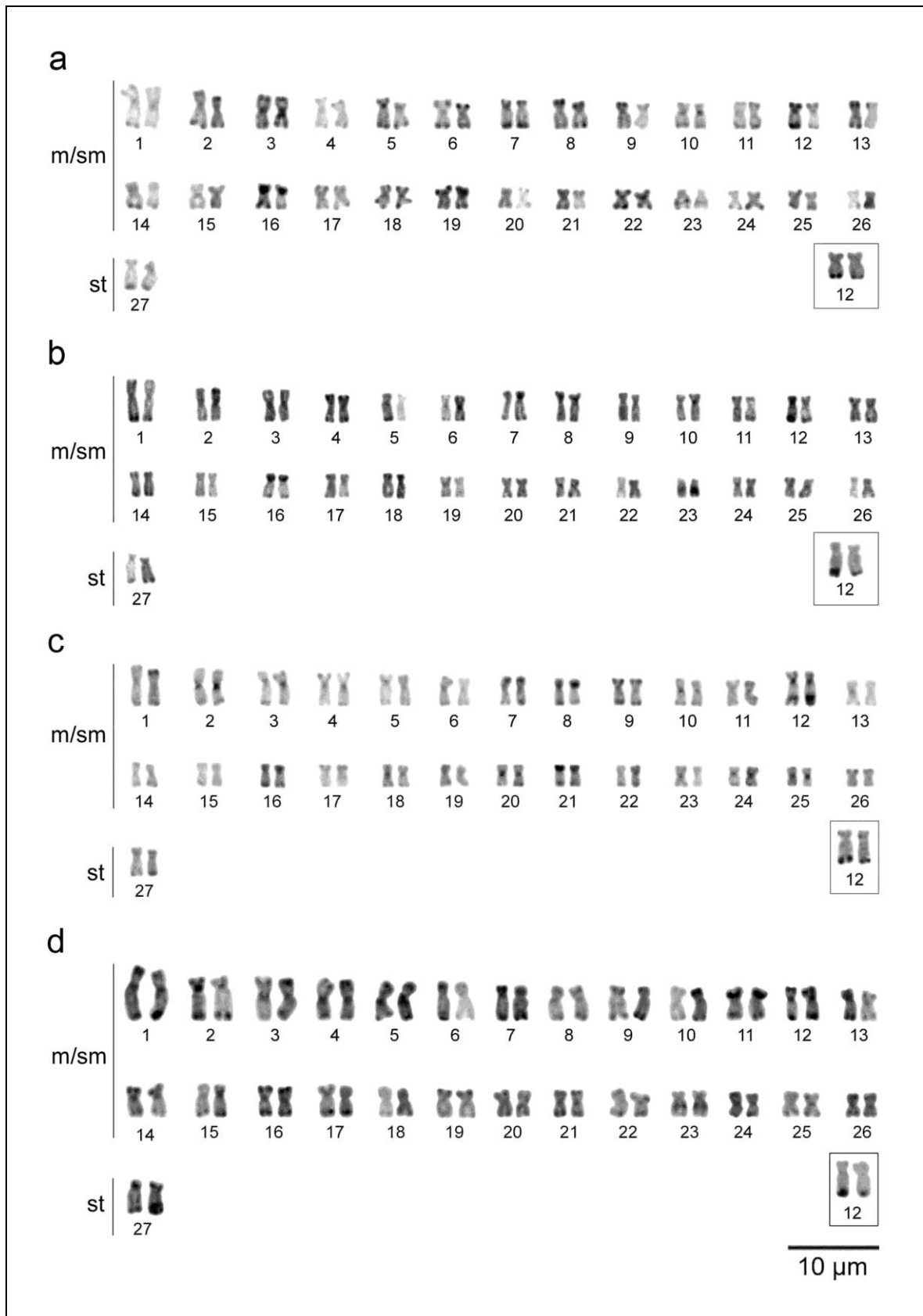


Figura 3. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) tratados com bandamento C. Em destaque os cromossomos portadores de sítios Ag-NORs positivos.

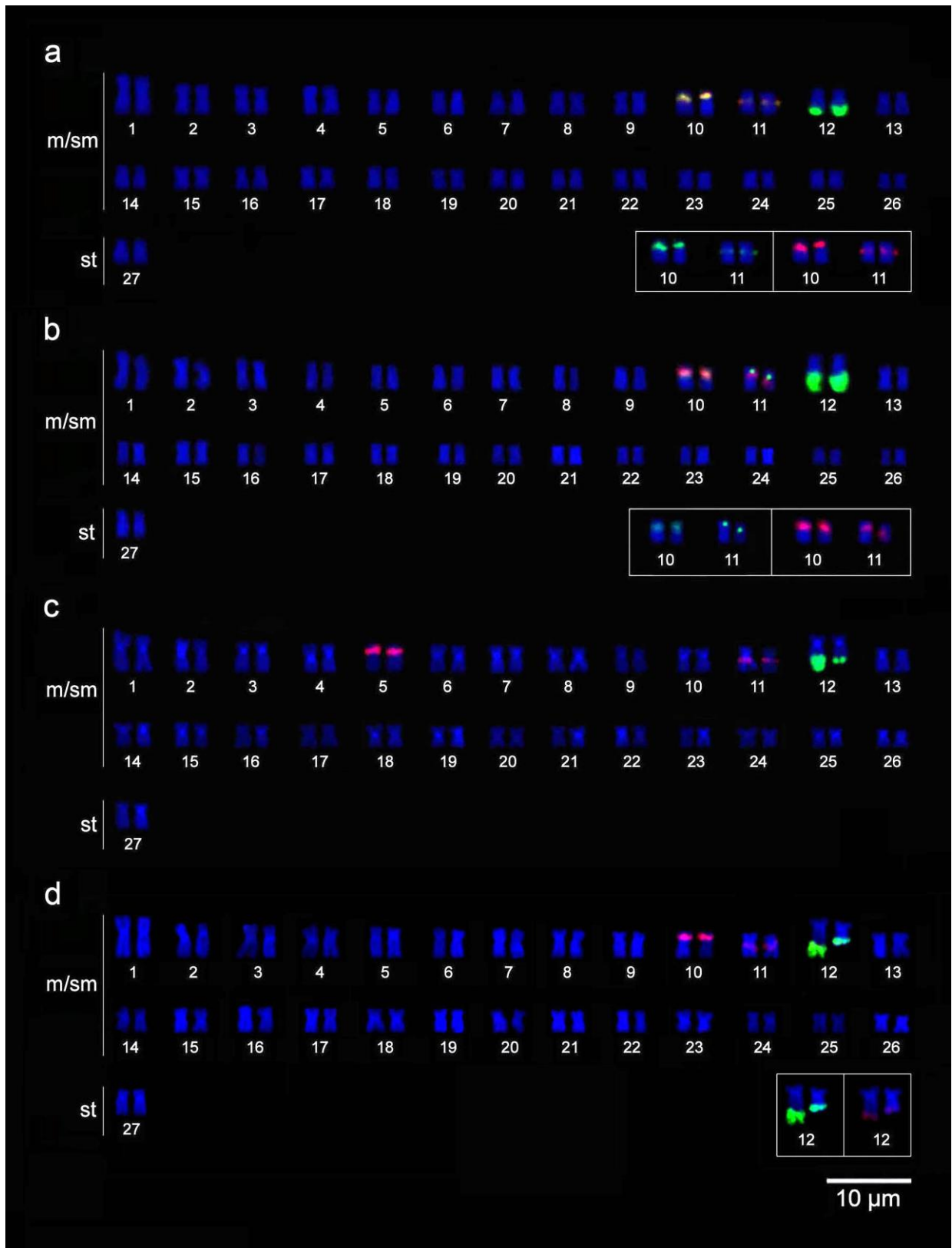


Figura 4. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S (sinal verde) e 5S (sinal vermelho). Em destaque os cromossomos portadores de sítios das duas sequências.

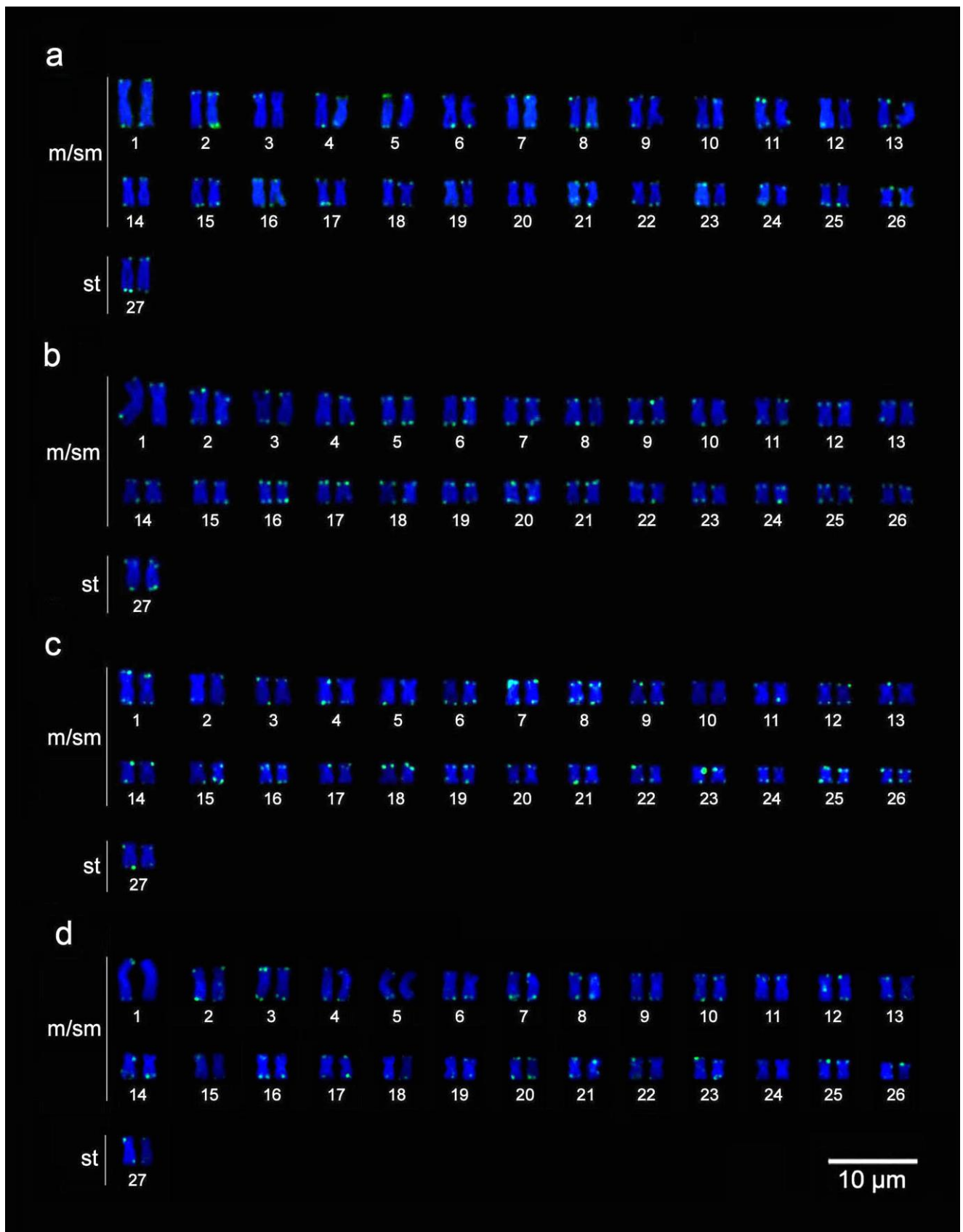


Figura 5. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda telomérica (TTAGGG)_n.

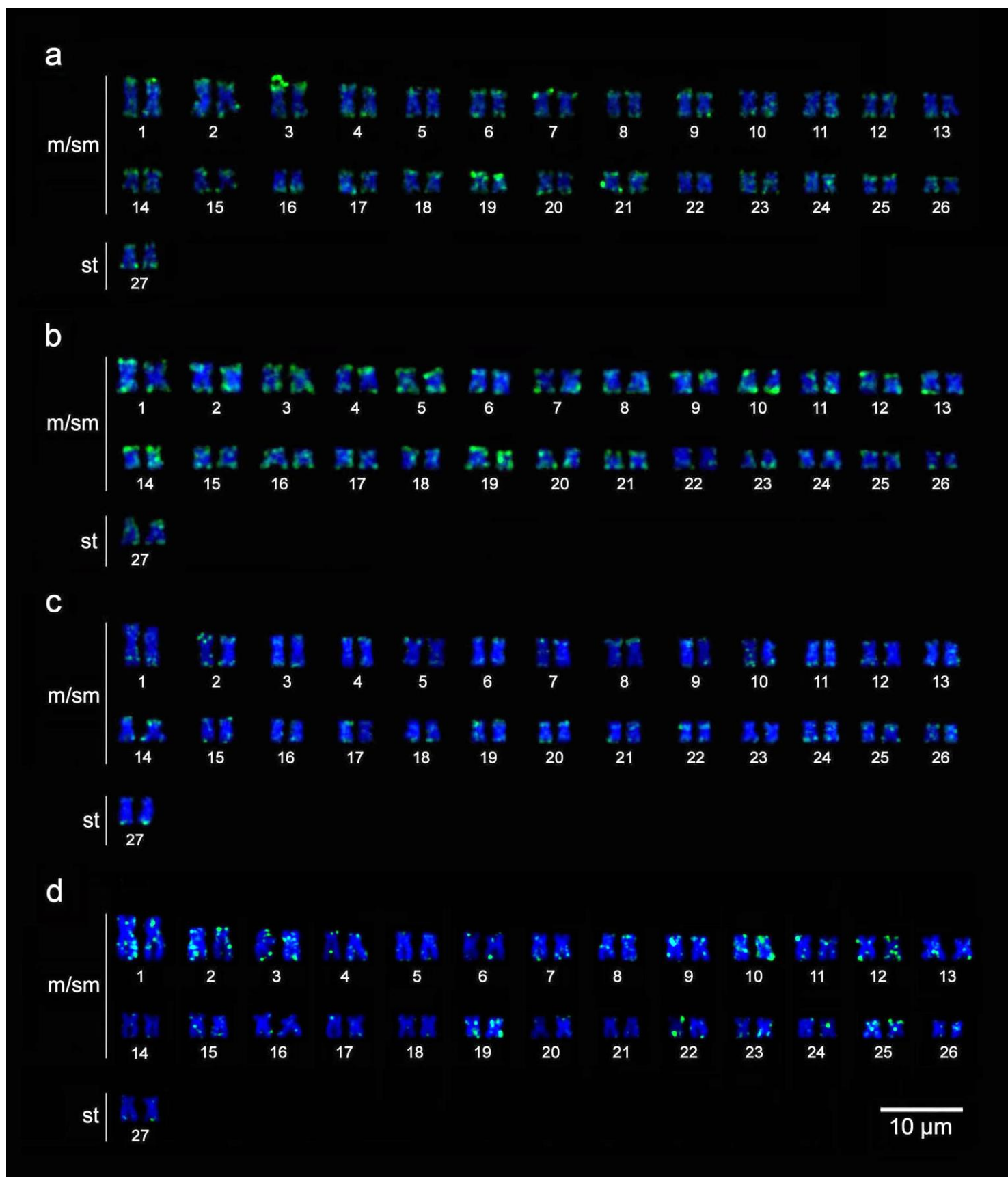


Figura 6. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda (GATA)_n.

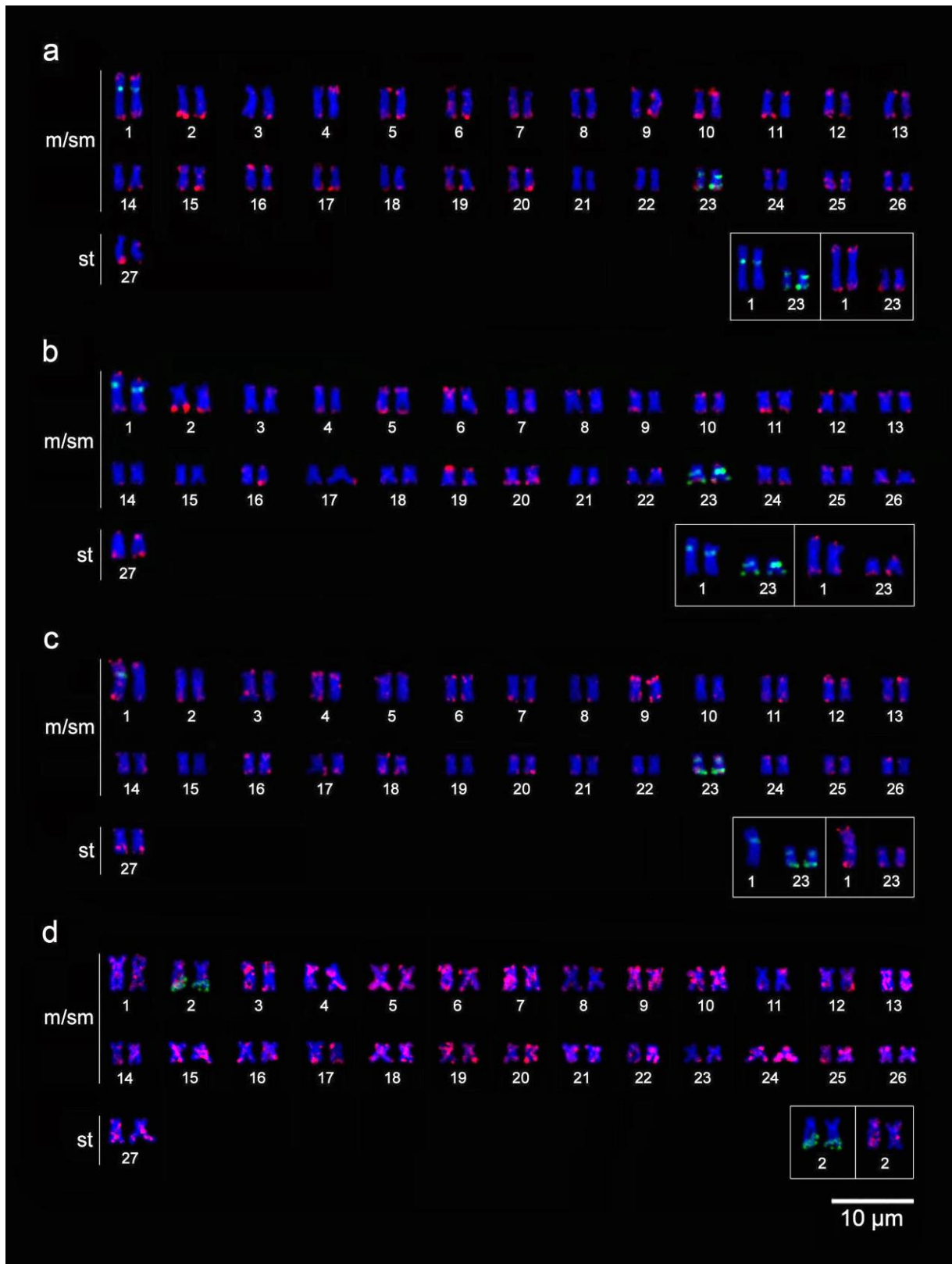


Figura 7. Cariótipos de *Apareiodon cavalcante* (a), *Apareiodon* sp. 1 (b), *Apareiodon* sp. 2 (c) e *Apareiodon machrisi* (d) submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNA satélite pPh2004 (sinal verde) e fração repetitiva WAp (sinal vermelho). Em destaque os cromossomos portadores de sítios das duas sequências.

Tabela 2. Distância Genética (média ± erro padrão) entre as espécies analisadas. Na diagonal principal (negrito) estão os valores intraespecíficos.

	<i>A. cavalcante</i>	<i>Apareiodon sp.1</i>	<i>Apareiodon sp. 2</i>	<i>A. machrisi</i>
<i>Apareiodon cavalcante</i>	0,0025±0,0011			
<i>Apareiodon sp. 1</i>	0,0086±0,0031	0,0025±0,0013		
<i>Apareiodon sp. 2</i>	0,0452±0,0083	0,0447±0,0080	0,0020±0,0010	
<i>Apareiodon machrisi</i>	0,0069±0,0031	0,0025±0,0010	0,0443±0,0083	0,0011±0,0006

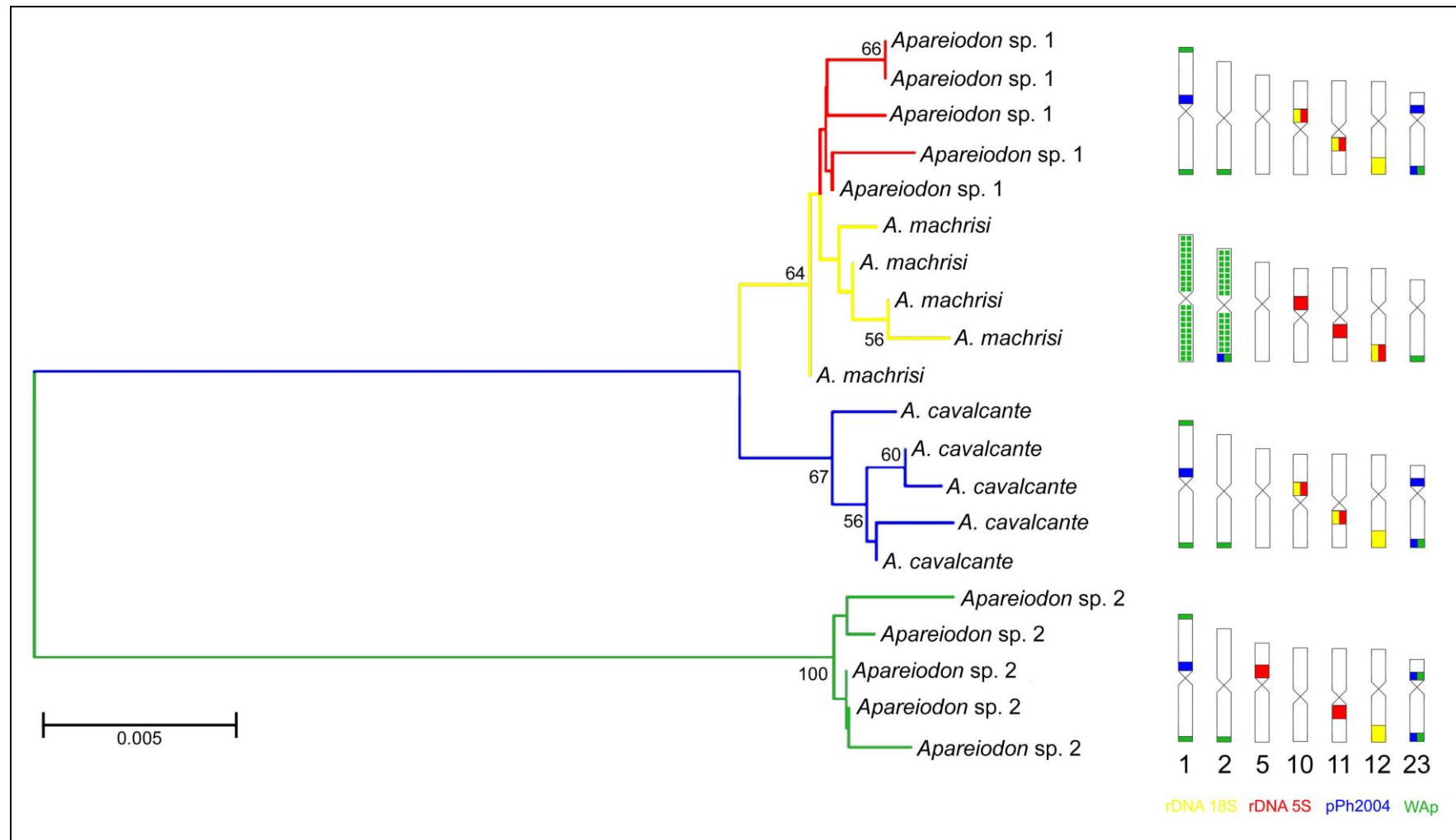


Figure 8. Árvore de Neighbour-Joining usando o modelo de distância Kimura-2-parâmetros. Números nos nós representam valores de bootstrap obtidos em 1000 pseudoréplicas. À direita, idiograma representativo dos pares cromossômicos marcadores e seus respectivos sítios das sondas utilizadas para as espécies analisadas.

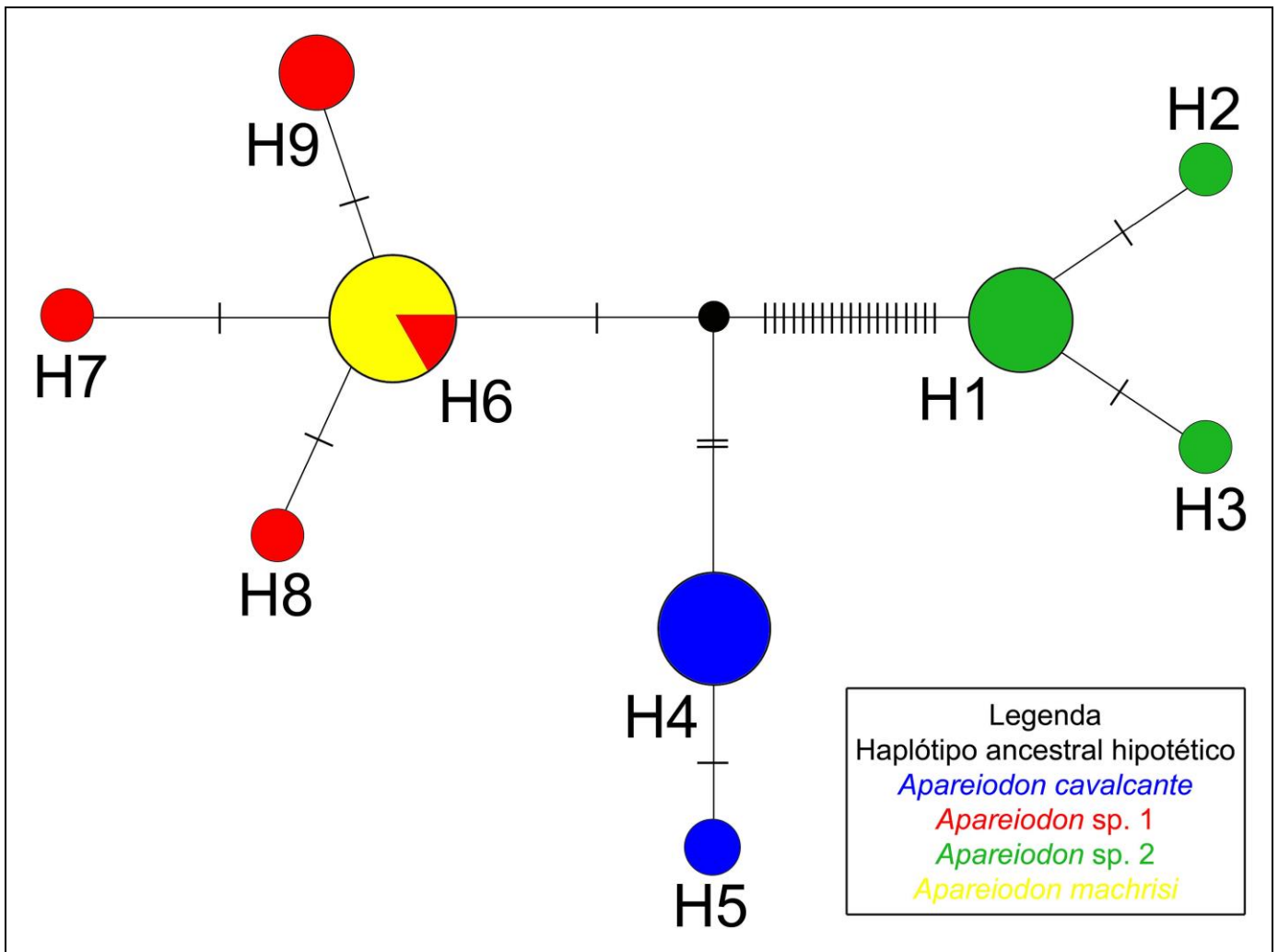


Figura 9. Rede de haplótipos formada com as amostras de *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi*. Os traços indicam passos mutacionais e o tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras correspondentes a cada haplótipo.

**Mapeamento cromossômico das sequências de histonas
H1 e H4 em espécies de Parodontidae (Characiformes).**

Artigo em preparação

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo analisar a localização cromossômica dos genes das histonas H1 e H4 em espécies de Parodontidae. Assim, sete espécies desta família (*Apareiodon cavalcante*, *Apareiodon machrisi*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *Apareiodon argenteus*, *Apareiodon davis* e *Parodon* cf. *pongoensis*) foram submetidas a hibridizações *in situ* fluorescentes com sondas destes genes, amplificadas a partir do genoma de *A. cavalcante*. As sequências obtidas na amplificação das histonas H1 e H4 apresentaram 626 e 213 pares de bases, respectivamente, exibindo similaridade com sequências parciais destes genes de outras espécies de peixes. Além disso, a sequência de H1 amplificada apresentou similaridade com um fragmento interno do elemento transponível ERV1-2 FCa-I. As hibridizações revelaram a ocorrência de co-localização destes genes em porção intersticial de um único par cromossômico (par 20 em *P. cf. pongoensis* e par 13 nas demais espécies), ocorrendo também um sítio adicional de H1 em *A. davis* e pequenos sítios dessa sequência dispersos pelos cariótipos de todas as espécies. Os resultados sugerem que o cluster H1-H4 alocado em apenas um par cromossômico seja a tendência para Parodontidae, indicando assim uma possível conservação desta clusterização em todas as espécies do grupo. Os pequenos sítios de H1 dispersos pelos cariótipos e o sítio adicional de *A. davis* provavelmente estão associados ao retroelemento inserido nesta sequência. Além disso, o sítio adicional de *A. davis* também pode ser resultado de rearranjos cromossômicos, bem como o par portador do cluster H1-H4 em *P. cf. pongoensis*. Apesar de ser sugerida a conservação da localização dos genes das histonas H1 e H4 em Parodontidae, as particularidades apresentadas por algumas espécies indicam que, em alguns casos, estes genes estão envolvidos em processos evolutivos que resultam em maior nível de diferenciação.

Palavras-chave: famílias multigênicas, marcadores cromossômicos, hibridização *in situ* fluorescente, peixes

Abstract

This study aimed at analyzing the chromosomal location of H1 and H4 histone genes in Parodontidae species. Seven species of this family (*Apareiodon cavalcante*, *Apareiodon machrisi*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *Apareiodon argenteus*, *Apareiodon davisii* and *Parodon* cf. *pongoensis*) were subjected to fluorescence *in situ* hybridizations with probes of these genes amplified from the genome of *A. cavalcante*. The H1 and H4 obtained sequences showed 626 and 213 base pairs respectively, showing partial similarity to sequences of these genes from other fish species. In addition, the H1 amplified sequence showed similarity to an internal fragment of the transposable element ERV1-2 FCa-I. The hybridizations revealed co-localization of these genes in interstitial portion of a single chromosome pair (pair 20 in *P. cf. pongoensis* and pair 13 in the other species), also occurring an additional site of H1 in *A. davisii* and small sites of this sequence dispersed along the karyotypes of all species. The results suggest that the H1-H4 cluster located at only one chromosome pair is the trend to Parodontidae family, indicating a possible conservation of this clusterization in all species of the group. The small sites of H1 dispersed along the karyotypes and the additional site of *A. davisii* are probably associated with retroelement inserted in this sequence. The H1 additional site of *A. davisii* can also result from chromosomal rearrangements, as well as the carrier pair of H1-H4 cluster in *P. cf. pongoensis*. Although it is suggested that the location of the H1 and H4 histone genes in Parodontidae is conserved, some features presented by certain species indicated that, in some cases, these genes are involved in developmental processes that result in higher level of differentiation.

Keywords: multigene families, chromosomal markers, fluorescence *in situ* hybridization, fish

5.3.1. Introdução

A família multigênica que codifica as histonas é composta pelos genes H1, H2A, H2B, H3 e H4, os quais se encontram presentes em todos os eucariotos (Kornberg, 1977; Eirín-López et al., 2004). Estas cinco classes de histonas podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com sua estrutura e função: (1) cerne de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) que interagem com o DNA para formar a estrutura dos nucleossomos; e (2) histona ligante (H1) que interage com o DNA entre os nucleossomos dando origem a estrutura do cromatossomo (Simpson, 1978).

O mapeamento físico de famílias multigênicas em peixes mostra-se importante em estudos de evolução cromossômica e estrutura genômica (Schemberger et al., 2011; Traldi et al., 2013; Martinez et al., 2015). Apesar da recente difusão de estudos cromossômicos com os genes de histonas em espécies de peixes, os dados disponíveis mostram-se restritos apenas a alguns grupos (Pendás et al., 1994; Hashimoto et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2013a, b).

Parodontidae é composta por 32 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2015), as quais se encontram distribuídas em três gêneros: *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon* (Pavanelli & Britski, 2003). Do ponto de vista cromossômico, a família apresenta manutenção do número diploide de 54 cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (Moreira-Filho et al., 1980; Vicari et al., 2010; Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). Apesar da conservação da macroestrutura, variações relacionadas à presença de cromossomos sexuais e localização cromossômica dos marcadores rDNAs 18S e 5S, DNA satélite pPh2004 e fração repetitiva WAp são evidenciadas (Moreira-Filho et al., 1980; Moreira-Filho et al., 1993; Centofante et al., 2002; Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2006; Rosa et al., 2006; Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011)

Em função da importância das famílias multigênicas como marcadores cromossômicos, o presente trabalho tem por objetivo analisar a localização cromossômica dos genes de histonas H1 e

H4 em espécies da família Parodontidae, a qual constitui um interessante modelo para estudos de evolução cromossômica.

5.3.2. Materiais e Métodos

Espécies analisadas

Foram analisadas sete espécies da família Parodontidae, pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tab. 1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio - licença N°10538-1) e os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram identificados e depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Tab. 1).

Metodologias moleculares

Foi realizada extração de DNA genômico de *A. cavalcante* a partir de porções do fígado, segundo protocolo de Sambrook et al. (2001). A sequência da histona H1 foi amplificada por PCR, utilizando-se os primers H1F (5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3') e H1R (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3') (Hashimoto et al., 2011), e a sequência da histona H4 foi amplificada através dos primers H4F2s (5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3') e H4F2er (5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3') (Pineau et al., 2005). As reações realizadas foram compostas por 100-200 ng de DNA genômico, 0,2µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5mM de cloreto de magnésio, Buffer 10x (sem cloreto) e água destilada. As condições do ciclo de PCR foram: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, com posterior ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos.

As reações de sequenciamento foram realizadas usando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI) e os produtos foram então sequenciados bidirecionalmente em sequenciadores automáticos de DNA: ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™). As sequências obtidas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999) e alinhadas com o algoritmo ClustalW integrado no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001).

As sequências foram analisadas através dos bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php) para identificação de similaridades.

Metodologias citogenéticas

Os cromossomos metafásicos foram obtidos de porções do rim anterior, seguindo os protocolos descritos por Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, sendo que a amplificação de H1 foi marcada com biotina 16-dUTP (Biotin Nick Translation mix, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), e a amplificação de H4 com digoxigenina 11-dUTP (Dig Nick Translation mix, Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as hibridizações *in situ* fluorescentes (FISH) seguiram o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), sobre alta condição de estringência de 77% (200 ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 – 7,2, a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas duas vezes em 15% formamida/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada e posteriormente foram efetuadas 2 lavagens de 5 minutos cada em 4xSSC/0.05% Tween em temperatura ambiente. As metáfases foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) e as imagens capturadas pelo próprio sistema da câmera (Olympus DP72).

5.3.3. Resultados

As sequências obtidas na amplificação das histonas H1 e H4 apresentaram 626 e 213 pares de bases (pb), respectivamente. Pela análise no BLAST, estas sequências mostraram similaridade com sequências parciais das histonas H1 e H4 de outras espécies de peixes. Pela análise no CENSOR, a sequência de H1 amplificada apresentou similaridade com um fragmento interno do elemento transponível ERV1-2 FCa-I entre os pares de bases 301 e 505 (Fig. 1).

A FISH com as sondas das histonas H1 e H4 revelaram a presença destas sequências na porção intersticial do braço curto do par cromossômico 13 em *A. cavalcante*, *A. machrisi*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. argenteus* e *A. davisii*, e do par cromossômico 20 em *P. cf. pongoensis*, ocorrendo co-localização dos sítios em todas as espécies. Um cluster adicional de H1-H1 foi verificado na porção terminal do braço longo do par 13 em *A. davisii*, e para todas as espécies analisadas observaram-se pequenos sítios de H1 dispersos pelo cariótipo (Fig. 2).

5.3.4. Discussão

O acúmulo de informações a respeito dos genes das histonas tem demonstrado que a estrutura, configuração e número de cópias destas sequências variam amplamente entre os organismos (Eirín-López et al., 2009). A partir de várias informações disponíveis em literatura, Eirín-López et al. (2009) propôs que, nas espécies de peixes, as histonas encontram-se organizadas em quintetos gênicos, repetidos aproximadamente 150 vezes no genoma, com arranjo *in tandem*. A co-localização das sondas de H1 e H4 observada em todas as espécies de Parodontidae analisadas no presente trabalho, assim como em *Astyanax fasciatus* para os genes de H1 e H3 (Pansonato-Alves et al., 2013a), em *Astyanax bockmanni* para H1, H3 e H4 (Silva et al., 2013), e em *Rachycentron canadum* para H2B-H2A e H3 (Costa et al., 2014) permite inferir sobre a provável clusterização dos genes histona neste grupo de peixes.

A localização cromossômica dos genes das histonas têm se mostrado conservada em espécies próximas de alguns grupos animais. Esta condição é observada para crustáceos (Barzotti et al., 2000), insetos (Cabrero et al., 2009; Cabral-de-Mello et al., 2011) e peixes (Pendás et al., 1994; Hashimoto et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2013a; Pansonato-Alves et al., 2013b). A presença do cluster H1-H4 em porção intersticial do braço curto de um único par cromossômico nas sete espécies analisadas no presente trabalho reforça esta ideia. Entretanto, as particularidades verificadas em *A. davisi* (cluster adicional H1-H4) e *P. cf. pongoensis* (par cromossômico portador do cluster H1-H4) refletem que estes genes também apresentam variações em sua localização, como já descrito em literatura para insetos (Oliveira et al., 2011), moluscos (Carrilho et al., 2011) e peixes (Pansonato-Alves et al., 2013b).

Além do bloco formado pelo cluster H1-H4 verificado em todas as espécies e o cluster adicional H1-H4 de *A. davisi*, observou-se também pequenos sítios de H1 dispersos pelo cariótipo das sete espécies, com variações no padrão de intensidade. A presença destes sinais dispersos pode ser associada ao fragmento derivado do retrovírus endógeno ERV1-2 FCa-I inserido na cópia do gene de H1 amplificada. Os retrovírus endógenos (ERVs) são retrotransposons que têm se acumulado ao longo do tempo no genoma de muitos organismos (Lee & Bieniasz, 2007). Desta maneira, os sítios dispersos evidenciados pela FISH com sonda de H1 podem representar fragmentos desse retroelemento. Em peixes, fragmentos derivados de retrovírus endógenos são identificados, porém a grande maioria deles exibe mutações e deleções que inviabilizam a produção de proteínas funcionais (Shen & Steiner, 2004). A inserção de apenas um fragmento do ERV1-2 FCa-I na cópia do gene H1 reforça esta tendência de degeneração.

O ERV1-2 FCa-I é um retrovírus endógeno descrito para a espécie de felino *Felis catus* (Pontius et al., 2007). De acordo com análise filogenética de vários retrovírus, Herniou et al. (1998) propõe que a transferência horizontal dos retrovírus entre diferentes classes de vertebrados seja um evento raro. Desta forma, a identificação da similaridade entre a sequência de um retrovírus de felino

e a sequência do gene de H1 de uma espécie de peixe sugere a existência deste retroelemento antes do evento de separação destes grupos.

Várias espécies de Parodontidae vêm sendo estudadas através de metodologias citogenéticas, com o intuito de compreender a evolução cromossômica da família (Moreira-Filho et al., 1984; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2012; Schemberger et al., 2014; Capítulos 1 e 2). Neste contexto, o mapeamento dos genes das histonas H1 e H4 pode contribuir para a construção deste cenário. Os resultados apresentados no presente trabalho indicam uma possível conservação do número de sítios e localização cromossômica no grupo, apesar de ocorrerem variações em *A. davisii* e *P. cf. pongoensis*. A manutenção do cluster H1-H4 em todas as espécies analisadas corresponde a um forte indício de que este bloco representa a condição ancestral para a família. Desta forma, a localização deste bloco num par cromossômico menor em *P. cf. pongoensis* pode ser consequência de rearranjos cromossômicos, especialmente deleções e translocações não-recíprocas, que resultaram na redução do tamanho deste par cromossômico. O cluster adicional de H1-H4 verificado em *A. davisii* possivelmente deve estar associado à dispersão através de elementos transponíveis, como o ERV1-2 FCa-I, ou a eventos de inversão e transposição.

Os resultados do presente trabalho representam os primeiros dados disponíveis para o mapeamento cromossômico de genes de histonas em Parodontidae. Eles sugerem que a ocorrência de um cluster formado pelos genes H1 e H4 alocado em apenas um par cromossômico seja a tendência para a família Parodontidae, indicando assim uma possível conservação destes marcadores em todas as espécies do grupo. Entretanto, as particularidades apresentadas por *A. davisii* e *P. cf. pongoensis*, e os sítios dispersos possivelmente associados a elementos transponíveis indicam que em alguns casos estes genes estão envolvidos em processos evolutivos que resultam em maior nível de diferenciação.

5.3.5. Agradecimentos

Os autores são gratos à Prof. Dr. Carla Simone Pavanelli pela identificação taxonômica dos espécimes; ao ICM-Bio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (licença n°10538-1) pela autorização da coleta do material; aos técnicos Pedro Luís Gallo, Luiz Henrique da Silva e Antônio Donizete da Silva pelos esforços de coleta e suporte técnico. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

5.3.6. Referências

- Barzotti, R.; Pelliccia, F.; Bucciarelli, E.; Rocchi, A. (2000). Organization, nucleotide sequence, and chromosomal mapping of a tandemly repeated unit containing the four core histone genes and a 5S rRNA gene in an isopod crustacean species. **Genome**. 43:341-345.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559-570.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Artoni, R.F.; Moreira Filho, O.; Vicari, M.R. (2012). Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**. 35(4):770-776.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.

- Cabral-de-Mello, D.C.; Martins, C.; Souza, M.J.; Moura, R.C. (2011). Cytogenetic Mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 Histone Genes in 4 Ancient Proscopiidae Grasshopper Species: Contribution to Understanding the Evolutionary Dynamics of Multigene Families. **Cytogenetic and Genome Research**. 132:89-93.
- Cabrero, J.; López-León, M.D.; Teruel, M.; Camacho, J.P.M. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome Research**. 17:397-404.
- Carrilho, J.; Pérez-García, C.; Leitão, A.; Malehiro, I.; Pasantes, J.J. (2011). Cytogenetic characterization and mapping of rDNAs, core histone genes and telomeric sequences in *Venerupis aurea* and *Tapes rhomboides* (Bivalvia: Veneridae). **Genetica**. 139:823-831.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 55:139-150.
- Costa, G.W.W.F.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2014). Unusual Dispersion of Histone Repeats on the Whole Chromosomal Complement and Their Colocalization with Ribosomal Genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144(1):62-7.
- Eirín-López, J.M.; Ruiz, M.F.; González-Tizón, A.M.; Martínez, A.; Sánchez, L.; Méndez, J. (2004). Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphan” features. **Journal of Molecular Evolution**. 58:131-144.
- Eirín-López, J.M.; González-Romero, R.; Dryhurst, D.; Méndez, J.; Ausió, J. (2009). Long-term evolution of histone families: old notions and new insights into their mechanisms of diversification across eukaryotes. In: **Evolutionary Biology: Concept, Modeling and Application**. Berlin: Springer.

- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2015). **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**.
Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Parodontidae>. Acesso agosto de 2015.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 134:64-71.
- Herniou, E.; Martin, J.; Miller, K.; Cook, J.; Wilkinson, M.; Tristemi, M. (1998). Retroviral Diversity and Distribution in Vertebrates. **Journal of Virology**. 72(7):5955-5966.
- Kornberg, R. (1977). The structure of chromatin. **Annual Review of Biochemistry**. 46:931-954.
- Lee, Y.N.; Bieniasz, P.D. (2007). Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. **PLoS Pathogens**. 3(1):e10.
- Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O. (2015). Occurrence of Natural Hybrids Among Sympatric Karyomorphs in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). **Zebrafish**. 12:281-287.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 33:83-91.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P. M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 26:564-568.

- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**. 46:115-125.
- Oliveira, N.L.; Cabral-de-Mello, D.C.; Rocha, M.F.; Loreto, V.; Martins, C.; Moura, R.C. (2014). Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular Cytogenetics**. 4:24.
- Pansonato-Alves, J.C.; Serrano, E.A.; Utsunomia, R.; Scacchetti, P.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013a). Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 23:477-489.
- Pansonato-Alves, J.C.; Hilsdorf, A.W.S.; Utsunomia, R.; Silva, D.M.Z.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013b). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 141:133-142.
- Pavanelli, C.S.; Britski, H.A. (2003). *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes) from the Tocantins-Araguaia basin, with description of three new species. **Copeia**. 2:337-348.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**. 103:147-152.
- Pineau, P.; Henry, M.; Suspène, R.; Marchio, A.; Dettai, A.; Debruyne, R.; Petit, T.; Lécu, A.; Moisson, P.; Dejean, A.; Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.P. (2005). A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**. 22:582-588.

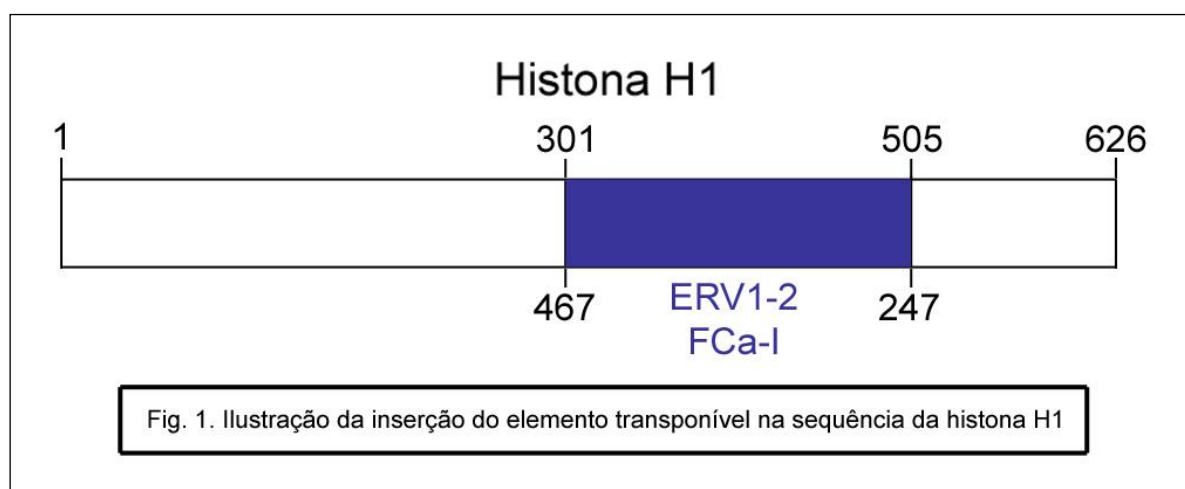
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Pontius, J.U.; Mullikin, J.C.; Smith, D.R.; Agencourt Sequencing, Lindblad-Toh, K.; Sante Gnerre; Clamp M.; Chang, J.; Stephens, R.; Neelam, B.; Volfovsky, N.; Schäffer, A.A.; Agarwala, R.; Narfström, K.; Murphy, W.J.; Giger, U.; Roca, A.F.; Antunes, A.; Menotti-Raymond, M.; Yuhki, N.; Pecon-Slattery, J.; Johnson, W.E.; Bourque, G.; Tesler, G.; NISC Comparative Sequencing Program; O'Brien, S.J. (2007). Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. **Genome Research**. 17:1675-1689.
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica**. 128:159-166.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. Nova Iorque: Laboratory Press.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11(6):518-527.
- Shen, C.-H.; Steiner, L.A. (2004). Genome Structure and Thymic Expression of an Endogenous Retrovirus in Zebrafish. **Journal of Virology**. 78(2):899-911.

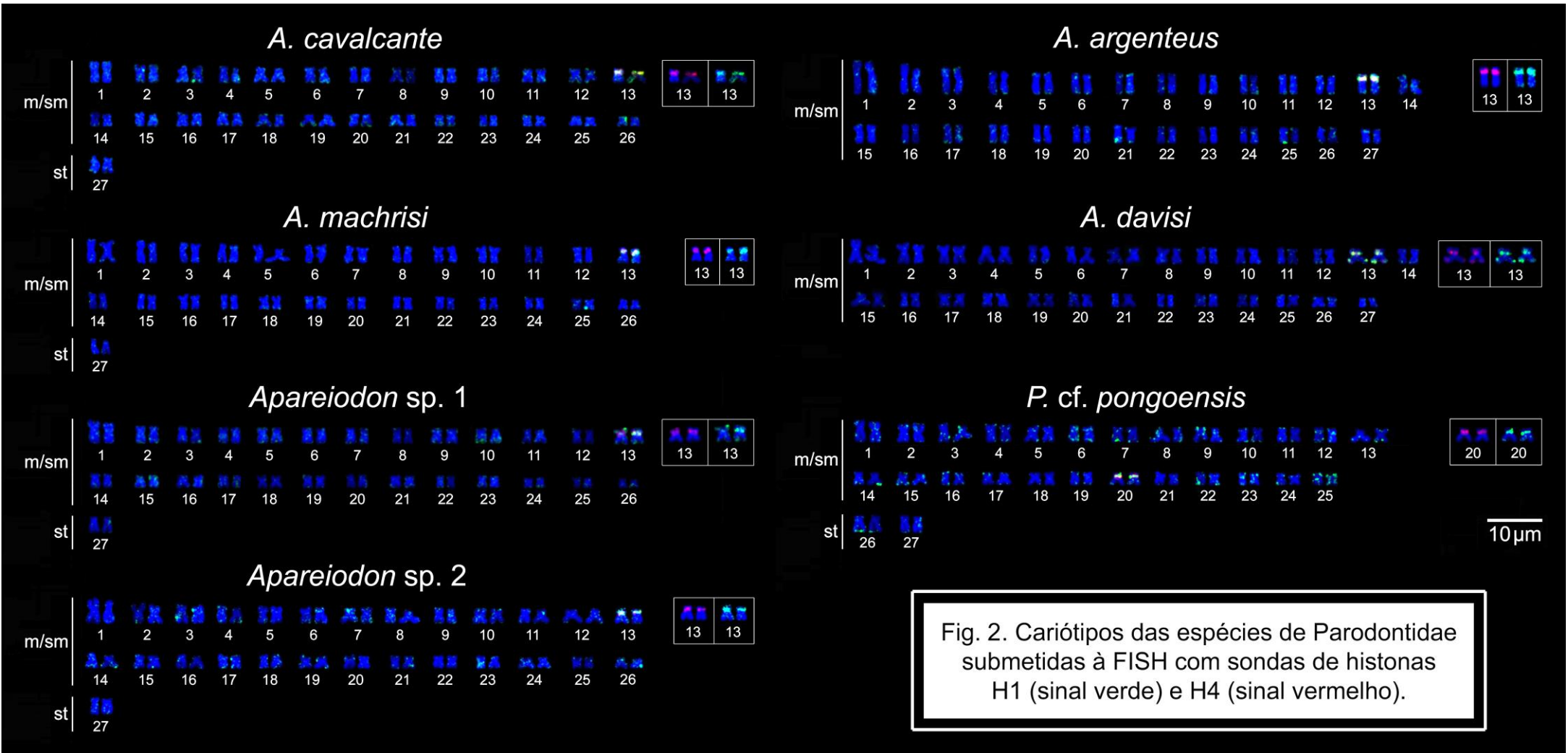
- Silva, D.M.Z.A.; Pansonato-Alves, J.C.; Utsunomia, R.; Daniel, S.N.; Hashimoto, D.T.; Oliveira C, Porto-Foresti, F.; Foresti, F. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**. 141:329-336.
- Simpson, R.T. (1978). Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. **Biochemistry**. 17:5524-5531.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Barros, A.V.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2013). Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genetics and Molecular Research**. 12:463-471.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetics and Genome Research**. 114:163-168.
- 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. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**. 119:115-120.
- Xia, X.; Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. 92:371-373.

5.3.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies coletadas e informações dos pontos de coleta.

Espécie	Nº exemplares	Localidade	Bacia hidrográfica	GPS	Depósito
<i>A. cavalcante</i>	54 ♂ e 15 ♀	rio Claro, Cavalcante (GO)	Tocantins-Araguaia	13°53'02,30" S 47°42'42,00" O	NUP 16232
<i>A. machrisi</i>	25 ♂ e 24 ♀	ribeirão Cristalino, Campinorte (GO)	Tocantins-Araguaia	13°43'14,38" S; 48°42'37,46" O	NUP 17079
<i>Apareiodon sp. 1</i>	10 ♂ e 9 ♀	rio Passa-Treizeinho, Uruaçu (GO)	Tocantins-Araguaia	14°31'19,20" S 49°11'13,30" O	NUP 16230
<i>Apareiodon sp. 2</i>	8 ♂ e 11 ♀	rio Bandeirinha, Formosa (GO)	Tocantins-Araguaia	15°28'49,99" S 47°20'31,84" O	NUP 16192
<i>A. argenteus</i>	5 ♂ e 3 ♀	rio Araguaia, Aragarças (GO)	Tocantins-Araguaia	15°53'32,70" S 52°15'03,21"	NUP 16227
<i>A. davisi</i>	21 ♂ e 32 ♀	rio Salgado, Icó (CE)	Jaguaribe	06°24'25,80" S 38°52'01,70" O	NUP 17080
<i>P. cf. pongoensis</i>	11 ♂ e 8 ♀	rio Araguaia, Aragarças (GO)	Tocantins-Araguaia	15°53'32,70" S 52°15'03,21"	NUP 16228





6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da diversidade genética de Parodontidae, apresentando dados cromossômicos e moleculares inéditos desta família.

Das 16 espécies de Parodontidae descritas para o território brasileiro, 11 apresentam estudos citogenéticos disponíveis. Com os resultados obtidos, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento dos dados cromossômicos de mais quatro espécies nominais e um grupo de indivíduos que ainda carece de descrição taxonômica: *Apareiodon* sp. 2. Neste contexto, contabilizando os dados aqui gerados e os disponíveis em literatura, são encontradas informações cromossômicas correspondentes a 16 unidades biológicas pertencentes à Parodontidae.

A contagem dos números diplóides evidenciaram a presença de $2n = 54$ cromossomos em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi*, *A. argenteus* e *A. davisii*. Para todas as outras espécies de Parodontidae já estudadas, este mesmo número cromossômico foi observado, indicando assim uma forte conservação do número diploide nesta família. Para as seis espécies analisadas, os blocos heterocromáticos mostraram-se preferencialmente alocados em porções centroméricas e terminais dos cromossomos, assim como ocorre para as outras espécies da família que não apresentam cromossomos sexuais diferenciados.

Foram identificadas regiões organizadoras de nucléolo simples em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi*, *A. argenteus* e múltiplas em *A. davisii*. Em literatura, observa-se também a ocorrência destas duas condições para a família Parodontidae, entretanto, a condição simples é mais frequente.

O gene ribossomal 45S apresentou variação entre as espécies analisadas, ocorrendo em condição simples em *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi* e *A. argenteus*, e em condição múltipla em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1 e *A. davisii*. Para o gene ribossomal 5S, *A. argenteus* exibiu apenas um par cromossômico portador da sequência; todas as outras espécies analisadas apresentaram sítios

múltiplos. Estes dados corroboram com as informações disponíveis em literatura para a família que indicam variações no padrão de localização dessas.

O DNA satélite pPh2004 mostrou-se presente no cariótipo de todas as espécies analisadas. A fração repetitiva WAp mostrou-se dispersa pelo cariótipo das seis espécies analisadas, sem ocorrência de acúmulos preferenciais, como verificado para outras espécies de Parodontidae sem cromossomos sexuais diferenciados

A sequência telomérica (TTAGGG)_n ocorreu apenas nas porções terminais dos cromossomos de *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi*, como verificado para outros parodontídeos. A sequência (GATA)_n mostrou-se dispersa pelo cariótipo das quatro espécies analisadas, sem ocorrência de acúmulos preferenciais, como verificado para outras espécies de Parodontidae sem cromossomos sexuais diferenciados.

As histonas H1 e H4 mostraram-se co-localizadas em único par cromossômico em *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi*, *A. argenteus* e *A. davisii*, *P. cf. pongoensis*, ocorrendo também um sítio adicional de H1 em *A. davisii* e pequenos sítios dessa sequência dispersos pelos cariótipos de todas as espécies. Estes dados representam as primeiras informações da localização cromossômica de genes histônicos para a família.

As análises comparativas com dados citogenéticos e moleculares realizadas para *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 1, *Apareiodon* sp. 2, *A. machrisi* revelaram divergência recente entre estes quatro conjuntos de indivíduos, sendo *A. cavalcante*, *Apareiodon* sp. 2 e *A. machrisi* espécies nominais. Portanto, *Apareiodon* sp. 2 representa uma possível espécie nova a ser descrita. Os exemplares de *Apareiodon* sp. 1, por sua vez, possivelmente constituem uma população de *A. machrisi*. Em função de estas populações estarem alocadas na bacia do Alto Tocantins, a divergência entre elas pode estar associada a processos de isolamento geográfico, mudanças de comportamento dirigidas por pressão de predação e competição por alimento.

Análises gerais de todos os dados cromossômicos conhecidos para Parodontidae revelam conservação da macroestrutura cariotípica, entretanto, análises mais detalhadas evidenciam a ocorrência de uma grande diversidade cromossômica em nível microestrutural. Os resultados apresentados no presente trabalho, juntamente aos disponíveis em literatura, indicam que esta diversidade da microestrutura cromossômica encontra-se claramente associada à dinâmica dos DNAs repetitivos.