

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANOEL OLIVEIRA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM PARODONTIDAE (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES): IDENTIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE.**

CURITIBA

2018

EMANOEL OLIVEIRA DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM PARODONTIDAE (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES): IDENTIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética-PPGEN, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná-UFPR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Co-Orientadora: Prof. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2018

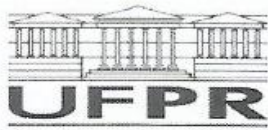
Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Santos, Emanuel Oliveira dos
Estudo citogenético e molecular em Parodontidae (Teleostei:
Characiformes): identificação de nova espécie. / Emanuel Oliveira dos
Santos. – Curitiba, 2018.
95 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo Ricardo Vicari
Co-orientadora: Marta Margarete Cestari
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Citogenética. 2. Peixe. I. Título II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. Cestari,
Marta Margarete. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 574.87



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **EMANOEL OLIVEIRA DOS SANTOS** intitulada: **Estudo citogenético e molecular em Parodontidae (Teleostei: Characiformes): Identificação de nova espécie.**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Março de 2018.

MARCELO RICARDO VICARI
Presidente da Banca Examinadora

IRIS HASS
Avaliador Externo

ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA
Avaliador Externo

KALINE ZIEMNICZAK
Avaliador Externo

DANIEL RODRIGUES BLANCO
Avaliador Externo

*Dedico este trabalho a minha esposa Roberta e aos meus filhos Arthur, Bruna,
Karell, Bruno e Karen, por fazerem parte da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes e significativas o suficiente que me permitam agradecer a todos que contribuíram nesta etapa com a devida justiça e com o devido merecimento, mas vou tentar...

Inicialmente gostaria de agradecer imensamente ao Prof. Dr. Marcelo Vicari, pelos exemplos de pai, amigo, parceiro, mestre, pesquisador e tarrafeiro, que mostrou ao longo deste período, e lhe dizer que me sinto muito honrado e privilegiado em ter sido seu orientando.

Agradecer a minha família, especialmente a Roberta Santos, minha querida esposa, companheira e parceira de todas as horas, por confiar e encorajar a realização deste projeto de vida. E aos filhos que pela sua singela existência nos indicam os caminhos que devemos seguir: Arthur, Bruna, Bruno, Karell e Karen.

A todos os colegas do Laboratório *Chromosome Biology Structure and Function* (CBSF Lab/UEPG), pela contribuição de cada um, naqueles momentos em que diversas dúvidas surgiram e sem os quais nada disso teria sido possível. Em especial, agradeço a Geize, pela imensa ajuda na parte da Citogenética, e ao Rafael na análise dos dados.

À Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari sempre esclarecendo dúvidas, e auxiliando no bom funcionamento do CBSF Lab.

Agradecer a todos os professores/pesquisadores do mais alto nível que tive o privilégio no decorrer deste curso de poder conhecer, trocar experiências, ouvir suas mais diversas considerações, e que contribuíram em muitos aspectos em minha formação, destaco entre tantos minha co-orientadora a Profa. Dra. Marta Margareth Cestari (UFPR) e o Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho (UFSCar).

Ao Programa de Pós Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná, estendo-se aos professores que fazem parte do Programa, e aos alunos (colegas) pela amizade.

A minha família, em especial aos meus pais, Adalberto (*in memorian*) e Maria, que dentro de suas possibilidades me concederam as oportunidades

necessárias para minha formação pessoal. Aos meus parentes de forma geral, mas com muito carinho ao meu irmão Toni (Antonio) que me deu suporte todas as vezes que estive em Belém, assim como a Aldeisa e ao Adalberto com suas palavras de incentivo e carinho. As minhas sogras, Valdenete e Mariazinha (Maria), por nos acompanharem e apoiarem em diversos momentos.

Agradeço a tantas outras pessoas que nos ajudaram na realização deste trabalho, diretamente ou indiretamente, como o casal de amigos Kazuko Tsuchyama e Getúlio (*in memoriam*) pelo grande incentivo.

A Secretaria de Estado de Educação - SEDUC/PA pela Licença Aperfeiçoamento Remunerada concedida no período compreendido.

Às agências de fomento CNPq, Fundação Araucária, SETI e FAPESP, e a CAPES (Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

E a essa Força Superior que nos refugia, apoia e orienta, concedendo força e sabedoria, para seguirmos enfrente, mesmo diante de todas as adversidades que nos são impostas neste mundo de provas e espiações.

Muito obrigado a todos!

[...]

Que a música que eu ouço ao longe
Seja linda, ainda que tristeza;
Que a mulher que eu amo seja pra sempre amada
Mesmo que distante;
Porque metade de mim é partida
Mas a outra metade é saudade...

[...]

Que essa minha vontade de ir embora
Se transforme na calma e na paz que eu mereço;
E que essa tensão que me corrói por dentro
Seja um dia recompensada;
Porque metade de mim é o que penso
Mas a outra metade é um vulcão...

[...]

Que não seja preciso mais do que uma simples alegria
para me fazer aquietar o espírito
E que o teu silêncio me fale cada vez mais;
Porque metade de mim é abrigo
Mas a outra metade é cansaço...

[...]

E que a minha loucura seja perdoada
Porque metade de mim é amor
E a outra metade... também.

METADE

Oswaldo Montenegro

RESUMO

Parodontidae é um grupo de peixes neotropicais, constituído por três gêneros: *Parodon*; *Apareiodon* e *Saccodon*. Esta família conta com 32 espécies válidas distribuídas na América do Sul e parte do Panamá, exceto nas bacias costeiras do Atlântico Sul, Patagônia e canal do rio Amazonas. Neste grupo, seus representantes são distinguidos morfológicamente por poucos e sutis caracteres diagnósticos. O número diploide tem sido conservado de 54 cromossomos entre os Parodontidae. No entanto, nestes peixes, a origem e a diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos têm sido descritas, proporcionando avanços no entendimento da evolução cariotípica. Com uso da pintura cromossômica W específica foram determinadas espécies sem cromossomos sexuais diferenciados, espécies com proto cromossomos sexuais e, espécies com sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW e ZW₁W₂. Aliado aos cromossomos sexuais, a distribuição dos DNAs repetitivos nos genomas dos parodontídeos tem proporcionado diferenciação cariotípica. Já a morfologia similar das espécies tem gerado dúvidas taxonômicas e para a descrição de espécies. Neste sentido, estudos que integraram características morfológicas, citogenéticas e de DNA Barcode proporcionaram uma melhor condição para entendimento das relações filogenéticas entre as espécies de Parodontidae. Este estudo teve por objetivo entender a diferenciação cariotípica e identificar se *Apareiodon* sp., coletado no rio Aripuanã, bacia Amazônica, corresponde a uma espécie não descrita em Parodontidae. Os dados de morfologia externa para *Apareiodon* sp. são similares às espécies *A. vittatus*, *A. piracicabae* e *A. affinis*. Contudo, as nadadeiras de *Apareiodon* sp. apresentam borda final enegrecida, o que não ocorre nas demais espécies. Na citogenética, o 2n = 54 cromossomos, fórmula cariotípica de 50 m/sm + 4 st, NF = 108 em ambos os sexos foi comum a outras espécies do gênero. Entretanto, um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW foi diagnosticado e, marcadores cromossômicos em localizações diferenciadas tornam o cariótipo de *Apareiodon* sp. exclusivo entre os Parodontidae. A análise filogenética e de genética de populações identificaram ramos com alto valor de suporte, sem introgressão e permitiram identificar *Apareiodon* sp. (rio Aripuanã) como uma unidade taxonômica molecular operacional. O conjunto de todos os resultados permitiram afirmar que *Apareiodon* sp. do rio Aripuanã apresenta isolamento do fluxo gênico às espécies congênicas e corresponde à uma espécie não descrita no grupo.

Palavras-chave: *Apareiodon*. rio Aripuanã. evolução cromossômica. DNA barcode.

ABSTRACT

Parodontidae is a group of Neotropical fishes consisting of three genera: *Parodon*, *Apareiodon* and *Saccodon*. This family has 32 valid species distributed in South America and part of Panama, except in the coastal basins of the South Atlantic, Patagonia and the channel of the Amazon river. In this group, their representatives are distinguished morphologically by a few subtle diagnostic characters. The diploid number has been conserved of 54 chromosomes among the Parodontidae. However, in these fish, the origin and differentiation of sex chromosomes morphologically have been described, providing advances in the understanding of karyotype evolution. With specific W chromosome painting, we determined species without differentiated sex chromosomes, species with proto sex chromosomes and species with heteromorphic sex chromosomes ZZ/ZW and ZW₁W₂. Allied to the sex chromosomes, the distribution of the repetitive DNAs in the genomes of the parodontids has provided karyotypic differentiation. The similar morphology of the species has generated taxonomic doubts and for the description of species. In this sense, studies that integrated morphological, cytogenetic and DNA Barcode characteristics provided a better condition for understanding phylogenetic relationships among Parodontidae species. This study aimed to understand the karyotype differentiation and to identify if *Apareiodon* sp., collected in the Aripuanã river, Amazon basin, corresponds to a species not described in Parodontidae. The external morphology data for *Apareiodon* sp. are similar to the species *A. vittatus*, *A. piracicabae* and *A. affinis*. However, the fins of *Apareiodon* sp. present blackened end border, which does not occur in the other species. In cytogenetics, 2n = 54 chromosomes, karyotype formula of 50 m/sm + 4 st, NF = 108 in both sexes was common to other species of the genus. However, a ZZ/ ZW sex chromosome system was diagnosed, and chromosomal markers at differentiated locations make the karyotype of *Apareiodon* sp. unique among the Parodontidae. The phylogenetic and population genetic analysis identified branches with high support value, without introgression and allowed to identify *Apareiodon* sp. (Aripuanã river) with an operational molecular taxonomic unit. The set of all the results allowed to affirm that *Apareiodon* sp. of the Aripuanã river presents isolation of the gene flow to the congeneric species and corresponds to a species not described in the group.

Keywords: *Apareiodon*. Aripuanã river. chromosomal evolution. DNA barcode.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1- LISTA DE FAMILIAS/ SUBFAMILIAS DA ORDEM CHARACIFORMES.. 2

TABELA 2- LISTA NOMINAL DE ESPÉCIES VÁLIDAS DA FAMÍLIA
PARODONTIDAE.....4

CAPÍTULO 1

TABLE I - ESTIMATES OF EVOLUTIONARY DIVERGENCE OVER SEQUENCE
PAIRS AMONG GROUPS 52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1- ESQUEMA DO MODELO DE KIMURA-2-PARAMETER.....	32
FIGURA 2- REGIÃO HIDROGRÁFICA AMAZÔNICA.....	19
FIGURA 3- EXEMPLA DE <i>Apareiodon</i> sp (RIO ARIPUANÃ- MT)	23
FIGURA 4- LOCAL DE COLETA DOS EXEMPLARES, RIO ARIPUANÃ- MT.....	38

CAPÍTULO 1

FIGURE 1- PHOTOGRAPHY OF THE <i>Apareiodon</i> sp. FROM THE ARIPUANÃ RIVER (A). SYMPHESIAN TEETH IMAGES SHOWING THE TOOTH MORPHOLOGY AND, CUSPIDS NUMBER (B). THE NUMBER IN EACH TOOTH REPRESENTS CUSPIDS COUNTING	53
FIGURE 2- KARYOTYPES OF THE MALES (A, B) AND FEMALES (C, D) <i>Apareiodon</i> sp. SPECIMENS. GIEMSA STAINING (A, C) AND C-BAND (B, D). BAR = 10 µM.....	54
FIGURE 3- KARYOTYPES OF THE <i>Apareiodon</i> sp. SUBMITTED TO PROBING FOR IN SITU LOCALIZATION: IN (A) 5S rDNA (GREEN); (B) 18S rDNA (RED); (C) <i>pPh</i> 2004 (GREEN) AND (GATA) <i>n</i> (RED) AND; (D) WAp PROBE (GREEN). BAR = 10 µM.....	55
FIGURE 4- K2P DISTANCE NJ DENDROGRAM SHOWING THE FIVE-ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE (THE NUMBERS ON THE BRANCHES ARE BOOTSTRAP VALUES).....	56
FIGURE 5- SPECIES TREE SHOWING PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS FROM THE FIVE FIVE-ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE. IN LEFT, BAYESIAN TOPOLOGY (THE NUMBERS	

ON THE BRANCHES ARE POSTERIOR PROBABILITY). IN RIGHT,
NEIGHBOUR JOINING TREE (THE NUMBERS ON THE BRANCHES
ARE BOOTSTRAP VALUES)57

FIGURE 6- MOLECULAR DATA OF *Apareiodon* sp. FROM THE ARIPUANÃ
RIVER. IN (A), HAPLOTYPE NETWORK AND RELATIONSHIP
AMONG HAPLOTYPES. IN (B) DISTRUCT PLOT FOR THE FIVE-
ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE58

LISTA DE SIGLAS

2n	- Número diploide
a	- Cromossomo acrocêntrico
AMOVA	- Análise molecular de variância
BAPS	- Bayesian analysis of population structure
BOLD	- The Barcode of Life Data System
CEUA	- Comissão de Ética do Uso de Animal
COI	- Citocromo c oxidase subunidade I
CTAB	- Brometo de cetil-trimetilamônio
DAPI	- 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DOP-PCR	- Degenerated oligonucleotide-primed PCR
FISH	- Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
ICMBio	- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITS	- Sítios teloméricos intersticiais
K2P	- Kimura-2-Parâmetros
m	- Cromossomo metacêntrico
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
MOTU	- Molecular Operational Taxonomic Unit
mtDNA	- DNA mitocondrial
NF	- Número fundamental
NJ	- Neighbor-Joining
pb	- Pares de base
PCR	- Polymerase chain reaction
rDNA	- DNA ribossomal
REW	- Região específica do cromossomo W
RON	- Região organizadora de nucléolo
sm	- Cromossomo submetacêntrico
st	- Cromossomo subtelocêntrico
TE	- Elemento transponível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ASPECTOS GERAIS DO GRUPO DOS PEIXES	16
1.2	ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NA FAMÍLIA PARODONTIDAE	21
1.3	DNA REPETITIVO	23
1.4	CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PARODONTIDAE	27
1.5	DNA BARCODE	29
1.6	CARACTERIZAÇÃO DO RIO ARIPUANÃ	34
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	ANÁLISES DA COLORAÇÃO CORPORAL, DENTES SINFISIANOS E CONTAGEM DAS CÚSPIDES	39
3.2	CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	39
3.2.1	OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS.....	39
3.2.2	BANDAMENTO C	40
3.3	SÍNTESE DE SONDAS E LOCALIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	40
3.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS CITOGENÉTICOS.....	41
3.5	EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
3.6	OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS COI	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	CAPÍTULO 1: CYTOGENETICS AND POPULATION GENETICS REVEAL AN UNDESCRIBED <i>APAREIODON</i> SPECIES (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE).....	44
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO 1- LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO MMA / IBAMA/ SISBIO	87
	ANEXO 2- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	88

ANEXO 3- OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS (BERTOLLO <i>et al.</i> , 2015).....	89
ANEXO 4- SÍNTESE DA SONDA DO rDNA 5S	90
ANEXO 5- MARCAÇÃO DA SONDA DO rDNA 18S.....	91
ANEXO 6- REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA (GATA) _n	92
ANEXO 7- HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	93
ANEXO 8- PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR PELO KIT DA GE HEALTHCARE – <i>ILLUSTRA</i> GFX PCR DNA.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO GRUPO DOS PEIXES

Os peixes representam o maior grupo de vertebrados existentes no planeta, com 34.725 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2018). Na região Neotropical, que compreende a América Central, a parte sul do México, a península da Baixa Califórnia, o sul da Flórida, todas as ilhas do Caribe e a América do Sul, encontramos a ictiofauna de água doce mais diversificada e rica do planeta, com mais de 5.700 espécies conhecidas e muitas outras sendo descritas anualmente (ALBERT; REIS, 2011).

Dentro deste universo de espécies destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi, representando mais de 70% da ictiofauna de água doce Neotropical (FINK; FINK, 1981; REIS *et al.*, 2003). Entre os Ostariophysi observamos extremos de tamanho que vai desde o maior peixe de água doce capturado no mundo *Pangasiodon gigas* Chevey, 1931, medindo 2,7 metros de comprimento e pesando 293 kg, até algumas espécies que medem cerca 12 mm, como *Danionella translucida* Roberts, 1986 (NELSON, 2006). Alguns desses peixes podem respirar oxigênio atmosférico (*Clariidae* Bonnaparte, 1846) ou mesmo viver fora da água como *Phreatobius cisternarum* Goeldi, 1905, e há ostariofisianos que são capazes de produzir eletricidade (*Malapteruridae* Bleeker, 1858) (NELSON, 2006).

A Ordem Characiformes, exclusivamente dulcícola, distribui-se nas Américas e na África, compreendendo cerca de 1.700 espécies válidas em 270 gêneros (NELSON, 2006). Entre os Characiformes há uma grande variação na forma corporal, estrutura de mandíbula, dentição e anatomia interna (VARI, 1998), e seus representantes estão agrupados em 24 famílias (TABELA 1).

A ictiofauna brasileira é distribuída de forma bastante heterogênea, dados de Reis *et al.*, (2003), indicam a ocorrência de cerca de 2.300 espécies dulcícolas, enquanto que marinhas em torno de 1.298 espécies (MENEZES *et al.*, 2003). Apenas cinco ordens detêm mais de 95% das espécies de peixes de água doce conhecidas, sendo Characiformes a mais numerosa, seguida dos Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Gymnotiformes (ROSA; LIMA, 2008).

TABELA 1- LISTA DE FAMILIAS/SUBFAMILIAS DA ORDEM CHARACIFORMES.

Ordem Characiformes

- Família Citharinidae Günther, 1864
- Família Distichodontidae Günther, 1864
- Família Crenuchidae Günther, 1864
- Subfamília Crenuchinae Günther, 1864
- Subfamília Characidiinae Fowler, 1932
- Família Alestidae Cockerell, 1910
- Família Hepsetidae Hubbs, 1939
- Família Tarumaniidae de Pinna, Zuanon, Rapp Py-Daniel & Petry, 2017
- Família Erythrinidae Valenciennes, 1847
- Família Parodontidae Eigenmann, 1910
- Família Cynodontidae Eigenmann, 1903
- Família Serrasalmidae Bleeker, 1859
- Família Hemiodontidae Bleeker, 1859
- Família Anostomidae Günther, 1864
- Família Chilodontidae Eigenmann, 1903
- Família Curimatidae Gill, 1858
- Família Prochilodontidae Eigenmann, 1909
- Família Lebiasinidae Gill, 1889
- Subfamília Lebiasininae Gill, 1889
- Subfamília Pyrrhulininae Bleeker, 1859
- Família Ctenoluciidae Schultz, 1944
- Família Chalceidae Fowler, 1958
- Família Triportheidae Fowler, 1940
- Subfamília Triportheinae Fowler, 1940
- Subfamília Agoniatinae Bleeker, 1859
- Subfamília Clupeacharacinae Fowler, 1958
- Família Gasteropelecidae Bleeker, 1859
- Família Bryconidae Eigenmann, 1912
- Subfamília Bryconinae Eigenmann, 1912
- Subfamília Salmininae Cockerell, 1915
- Família Iguanodectidae Eigenmann, 1909
- Família Acestrorhynchidae Eigenmann, 1912
- Subfamília Acestrorhynchinae Eigenmann, 1912
- Subfamília Roestinae Lucena & Menezes, 1998
- Subfamília Heterocharacinae Géry, 1966
- Família Characidae Latreille, 1825
- Subfamília Characids *incertae sedis*

Subfamília Rhoadsiinae Fowler, 1911
Subfamília Aphyoditeinae Géry, 1972
Subfamília Pristellinae Géry & Boutière, 1964
Subfamília Gymnocharacinae Eigenmann, 1909
Subfamília Stethaprioninae Eigenmann, 1907
Subfamília Tetragonopterinae Gill, 1858
Subfamília Characinae Latreille, 1825
Subfamília Aphyocharacinae Eigenmann, 1909
Subfamília Cheirodontinae Eigenmann, 1915
Subfamília Stevardiinae Gill, 1858

FONTE: Adaptado de <https://www.calacademy.org/scientists/catalog-of-fishes-classification>
(acesso em 01/2018).

A família Parodontidae é composta por apenas três gêneros: *Apareiodon* Eigenmann, 1916; *Parodon* Valenciennes, 1849 e *Saccodon* Kner, 1863 (PAVANELLI, 2003). Conta atualmente com 32 espécies válidas, sendo 15 destas pertencentes à *Apareiodon*, 14 de *Parodon* e três ao gênero *Saccodon* (ESCHMEYER; FONG, 2018; TABELA 2). Espécies do gênero *Saccodon* tem distribuição restrita ao norte do continente sul-americano, sendo encontrado na bacia costeira no Panamá, Colômbia e Equador (ROBERTS, 1974), enquanto os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* distribuem-se por toda a América do Sul (PAVANELLI; BRITSKI, 2003).

A primeira espécie a ser descrita na família Parodontidae deu-se no início do século XIX a partir exemplares coletados no lago Maracaibo (Venezuela), e descritos por Achille Valenciennes em 1849 com o nome de *Parodon suborbitalis*. A caracterização da nova espécie e gênero se deu pelo posicionamento da boca e dentição, principalmente a dentição mandibular (CUVIER; VALLENCIENES, 1849 *apud* do NASCIMENTO, 2015). A partir de então, novas espécies foram sendo descritas e alocadas em diferentes famílias e subfamílias até serem reconhecidas propriamente como uma família (Parodontidae) por Greenwood *et al.* (1966).

Os representantes desta família são conhecidos popularmente no Brasil como “canivetes” ou “charutinhos” e “virolitos” ou “rollizos” em outras regiões da América Latina (PAVANELLI, 2003). São peixes com morfologia externa relativamente uniforme, com corpo fusiforme, boca ventral e nadadeiras peitorais dispostas lateralmente (PAVANELLI, 2003). Usualmente as espécies desta família

são genericamente alocadas com base em dois caracteres tradicionais, presença vs. ausência de dentes no dentário mandibular, e um vs. dois raios não ramificados na nadadeira peitoral (PAVANELLI, 2003).

TABELA 2- LISTA NOMINAL DE ESPÉCIES VÁLIDAS DA FAMÍLIA PARODONTIDAE.

Espécies	Autores
<i>Apareiodon affinis</i>	Steindachner, 1879
<i>Apareiodon agmatos</i>	Taphorn, López-Fernández & Bernard, 2008
<i>Apareiodon argenteus</i>	Pavanelli & Britski, 2003
<i>Apareiodon cavalcante</i>	Pavanelli & Britski, 2003
<i>Apareiodon davisii</i>	Fowler, 1941
<i>Apareiodon gransabana</i>	Starnes & Schindler, 1993
<i>Apareiodon hasemani</i>	Eigenmann, 1916
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Amaral Campos, 1944
<i>Apareiodon itapicuruiensis</i>	Eigenmann & Henn, 1916
<i>Apareiodon machrisi</i>	Travassos, 1957
<i>Apareiodon orinocensis</i>	Bonilla, Machado-Allison, Silvera, Chernoff, López & Lasso, 1999
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Eigenmann, 1907
<i>Apareiodon tigrinus</i>	Pavanelli & Britski, 2003
<i>Apareiodon vittatus</i>	Garavello, 1977
<i>Apareiodon vladii</i>	Pavanelli, 2006
<i>Parodon alfonsoi</i>	Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011
<i>Parodon apolinari</i>	Myers, 1930
<i>Parodon atratoensis</i>	Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011
<i>Parodon bifasciatus</i>	Eigenmann, 1912
<i>Parodon buckleyi</i>	Boulenger, 1887
<i>Parodon caliensis</i>	Boulenger, 1895
<i>Parodon carrikeri</i>	Fowler, 1940
<i>Parodon guyanensis</i>	Géry, 1960
<i>Parodon hilarii</i>	Reinhardt, 1867
<i>Parodon magdalenensis</i>	Londoño-Burbano, Román-Valencia & Taphorn, 2011
<i>Parodon moreirai</i>	Ingenito & Buckup, 2005
<i>Parodon nasus</i>	Kner, 1859
<i>Parodon pongoensis</i>	Allen, 1942
<i>Parodon suborbitalis</i>	Valenciennes, 1850
<i>Saccodon dariensis</i>	Meek & Hildebrand, 1913
<i>Saccodon terminalis</i>	Eigenmann & Henn, 1914
<i>Saccodon wagneri</i>	Kner, 1863

FONTE: Modificado de Eschmeyer; Fong (2018).

Diferenças morfológicas nestes três gêneros estão relacionadas com a coloração do corpo e o padrão dentário, cuja presença de dentes mandibulares é uma característica exclusiva do gênero *Parodon* (ROBERTS, 1974; TRAVASSOS, 1955; PAVANELLI, 2003). Já o número de cúspides e morfologia dos dentes pré-maxilares é utilizada para diferenciar os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* enquanto o

gênero *Saccodon* é caracterizado por apresentar acentuado polimorfismo dentário (ROBERTS, 1974; TRAVASSOS, 1955; PAVANELLI, 2003). Além disso, o padrão de coloração do corpo composto por listras (horizontais) ou barras (verticais) também é utilizado para diferenciá-los (TRAVASSOS, 1955; ROBERTS, 1974; PAVANELLI, 2003; 2007; INGENITO, 2008).

A utilização exclusiva de aspectos morfológicos diagnósticos para diferenciar os gêneros desta família tem sido há muito tempo questionado e considerados inconsistentes, com isso, questionamentos a respeito da manutenção dos gêneros *Apareiodon* e *Parodon* foram levantados (ROBERTS, 1974; SHULTZ; MILES, 1943; PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO; BUCKUP, 2005; INGENITO, 2008).

Utilizando métodos de parcimônia para análise filogenética Ingenito (2008) usou caracteres osteológicos e de morfologia externa de 28 espécies de Parodontidae, uma espécie não descrita de *Apareiodon* sp. (chamada de *Parodon* sp.), e 17 espécies de Characiformes como grupo externo. Considerando o gênero *Saccodon* como um grupo irmão dos demais Parodontidae, e o gênero *Apareiodon* como sinônimo júnior de *Parodon*, considerou também ineficaz a presença de dentes mandibulares para diagnosticar grupos monofiléticos, pois grupos definidos por este caráter são polifiléticos, relatando variações intraespecíficas na ocorrência destes nas espécies *P. davisii*, *P. ibitiensis*, *P. moreirai*, *P. tigrinus* e *Parodon* sp.

Schemberger *et al.* (2011) utilizaram análises comparativas de características cromossômicas distintas (número e fórmula cariotípica, bandamento C, NORs, FISH com as sondas rDNA 5S, rDNA 18S, pPh2004 e WAp) para a análise filogenética e agruparam a espécie *A. affinis* com as espécies do gênero *Parodon*, indicando um maior parentesco entre eles quando comparado com outras espécies do gênero *Apareiodon*. Entretanto, neste estudo *Parodon* e *Apareiodon* formam clados distintos, com exceção de *A. affinis*. Em contrapartida, estudos com sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI) de espécies do gênero *Parodon* e *Apareiodon* mostraram a ocorrência de dois clados bem sustentados, incluindo *A. affinis* no gênero de origem (BELLAFRONTI *et al.*, 2013). Desta forma, embora questionamentos ocorram em relação ao agrupamento de espécies em seus gêneros, a manutenção de *Parodon* e *Apareiodon* é a situação usual.

1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NA FAMÍLIA PARODONTIDAE

O uso de marcadores cromossômicos para a compreensão da diferenciação cariotípica de Parodontidae corresponde a uma importante ferramenta, que permite verificar homeologias cromossômicas, além de também contribuir com a citotaxonomia (VICARI *et al.*, 2010). Estudos citogenéticos nesta família foram utilizados para auxiliar em dúvidas taxonômicas, a exemplo de espécies sinônimas (BELLAFRONTI *et al.*, 2005), e na indicação de novas espécies (ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Entretanto, o foco principal tem sido a compreensão da evolução cariotípica no grupo, com destaque para a diferenciação dos cromossomos sexuais, rearranjos cromossômicos estruturais e movimentação dos DNAs repetitivos nos genomas (BELLAFRONTI *et al.*, 2011; SCHEMBERGER *et al.*, 2011, 2014, 2016; ZIEMNICZAK *et al.*, 2014; TRALDI *et al.*, 2016; do NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Dados de número e morfologia dos cromossomos, padrão de bandas, número e a posição dos sítios de DNAs ribossomais e a localização de DNAs repetitivos satélites identificam características compartilhadas e derivadas entre espécies próximas, os quais contribuem para o entendimento de espécies divergentes (VICARI *et al.*, 2006; da SILVA *et al.*, 2015; de OLIVEIRA *et al.*, 2016), complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991) e padrões biogeográficos (VICARI *et al.*, 2008; da ROSA *et al.*, 2014).

As análises citogenéticas em Parodontidae revelam um número diplóide conservado de 54 cromossomos, na maioria de metacêntricos e submetacêntricos (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1980; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006), sendo os cromossomos subtlocêntricos ausentes ou variando entre um a três pares entre as espécies (BELLAFRONTI *et al.*, 2011; SCHEMBERGER *et al.*, 2011). Exceções ocorrem em populações de *A. affinis* do baixo rio Paraná (Argentina) e rio Paraguai, as quais apesar de apresentar número $2n = 54$, possuem uma variação de 2 a 8 pares de cromossomos do tipo acrocêntrico (JORGE; MOREIRA-FILHO, 2000; 2004; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Variações de número cromossômico em Parodontidae foram relatadas em *A. piracicabae* coletados no rio Passa Cinco, Rio Claro – SP, devido à presença de

cromossomos B (FALCÃO *et al.*, 1984). Se considerarmos ao nível de gênero, verificamos que em *Apareiodon* é comum à ocorrência de cromossomos subtelocêntricos com variação interespecífica de um a três pares (ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2009; 2011; 2013). No gênero *Parodon* percebe-se, de maneira geral, uma estrutura cariotípica constituída de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e, subtelocêntricos (BELLAFRONTE *et al.*, 2005, 2011), enquanto que, no gênero *Saccodon*, com uma distribuição restrita a região noroeste da América do Sul, há escassez de dados a respeito da estrutura cariotípica (VICARI *et al.*, 2006).

Desta forma, os cariótipos diferenciados em *Apareiodon* e *Parodon* são determinados a partir de características cromossômicas exclusivas, como: presença de fórmulas cariotípicas distintas; variações numéricas e de posição de sequências do DNA satélite pPh2004; número e localização de sítios de DNA ribossomal (rDNA) 18S e 5S; diferentes blocos heterocromáticos e presença de diferenças morfológicas nos cromossomos sexuais (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984; 1985; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; CENTOFANTE *et al.*, 2002; VICENTE *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2009, 2011, 2012; TRALDI *et al.*, 2016; do NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Sítios organizadores de nucléolos detectados por Ag-RONs e/ou por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com uso da sonda de rDNA 18S foram localizados na região terminal do braço *q* (longo) de um par cromossômico subtelocêntrico grande em quase todas as espécies de *Apareiodon* estudadas (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984; JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2009; 2011; 2012; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). No gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie-específicos localizados em cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (JESUS; MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE *et al.*, 2001; CENTOFANTE *et al.*, 2002; BELLAFRONTE *et al.*, 2005). Sítios adicionais do rDNA 18S já foram detectados em cariótipos de *A. vittatus*, *A. ibitiensis*, *A. affinis* (rio Uruguai) e *A. davisii* (BELLAFRONTE *et al.*, 2009; 2011; TRALDI *et al.*, 2016; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Desta forma, rearranjos cromossômicos com reposicionamento dos sítios cromossômicos ribossomais ocorreram na diversificação cariotípica destas espécies (BELLAFRONTE *et al.*, 2011) e foram propostos ter

origem por eventos de dispersão de RONS por transposição ou associação com movimento da heterocromatina (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984; TRALDI *et al.*, 2016).

Em relação ao rDNA 5S, a localização próxima a região centromérica de um par submetacêntrico (ocupando quase a totalidade da extensão do braço p) é a mais comum entre os parodontídeos (CENTOFANTE *et al.*, 2002; VICARI *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2009). Sítios rDNA 5S com localizações variáveis ocorrem em algumas espécies (ROSA *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2011; TRALDI *et al.*, 2016). *Parodon nasus* é a única espécie da família em que foi diagnosticado os rDNAs 5S e 18S sintênicos, que provavelmente foi originado por um evento de translocação cromossômica (BELLAFRONTE *et al.*, 2005).

A heterocromatina constitutiva em cromossomos de Parodontidae foi localizada nas regiões centroméricas e pericentroméricas, além de regiões heterocromáticas terminais em alguns cromossomos (BELLAFRONTE *et al.*, 2011, 2012; TRALDI *et al.*, 2016; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). A detecção da heterocromatina é imprescindível na identificação dos cromossomos sexuais entre os parodontídeos portadores do sistema ZZ/ZW, pois o cromossomo Z, na maioria das espécies, apresenta pequenos blocos heterocromáticos, sendo um proximal e outro terminal no braço p (curto), e o cromossomo W apresenta um processo de heterocromatização e acúmulo de sequências repetitivas na diferenciação em relação ao cromossomo Z (CENTOFANTE *et al.*, 2002; VICENTE *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006; BELLAFRONTE *et al.*, 2012).

1.3 DNA REPETITIVO

Os DNAs repetitivos representam grande porcentagem do genoma eucariótico consistindo de sequências que podem ser idênticas ou similares, que se repetem diversas vezes podendo ocorrer *in tandem* (em sequência) ou estar dispersos no genoma (TIMBERLAKWE, 1978; SUMNER, 2003). Por muito tempo o DNA repetitivo foi considerado como DNA lixo (*junk DNA*), DNA egoísta (*selfish DNA*) ou DNA parasítico (*parasitic DNA*) (DOOLITTLE; SAPIENZA, 1980; ORGEL; CRICK, 1980; NOWAK, 1994). Atualmente se sabe que estas repetições possuem funções estruturais e organizacionais, na regulação de genes, rearranjos cromossômicos, replicação, reparo de DNA, diferenciação e regulação

cromossômica, podendo também estar envolvido na causa de algumas doenças (SUMNER, 2003). Também possuem interesse especial em estudos de estrutura e função cromossômica, evolução, identificação de rearranjos cromossômicos, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; SUMNER, 2003; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018).

Os DNAs repetitivos *in tandem* são classificados de acordo com sua unidade de repetição, a qual varia em tamanho, onde maiores que 100 pb são denominadas de satélites clássicos, de 10-100 pb minissatélites e 2-6 pb microssatélites (SUMNER, 2003). Localizados em regiões centroméricas/pericentroméricas e ocasionalmente em regiões intersticiais e terminais dos cromossomos (CHARLESWORTH *et al.*, 1994). A composição deste DNA repetitivo pode variar de A-T ricos ou G-C ricos (BERIDZE, 1986). Incluso na classificação do DNA repetitivo *in tandem* há também as famílias multigênicas como, por exemplo, as histonas e o DNA ribossômico (LONG; DAVID, 1980).

A origem do DNA satélite é explicada a partir de vários mecanismos como a replicação saltatória (BRITTEN; KOHNE, 1966; 1968), o crossing-over desigual (SMITH, 1974) e por elementos transponíveis (HEIKKINEN *et al.*, 1995). Pode estar organizado em sítios específicos de um par cromossômico, porém na maioria das vezes, estas unidades de repetição evoluem em paralelo (DOVER, 1986), levando a uma homogeneização intraespecífica entre as unidades repetitivas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002). Esta distribuição cromossômica reflete o modo de evolução em conserto de sequências entre cromossomos não homólogos, como proposto para a origem dos DNAs repetitivos (PLOHL *et al.*, 1992). Nestes casos, a dispersão intercromossômica seria mais rápida que as taxas de mutação e/ou homogeneização intracromossômica. Diante da dinâmica evolutiva extremamente variável dos DNAs satélites estes podem, de fato, prover informações úteis tanto para estudos microevolutivos (UGARKOVIC; PLOHL, 2002), como para estudos filogenéticos (PONS *et al.*, 2002; PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK *et al.*, 2009). No entanto, famílias de DNA satélite podem, paralelamente, permanecer conservadas ao longo do tempo por terem evolução lenta, mantidas por baixas taxas de mutação, com reflexo na homogeneização das sequências (DE LA HERRÁN *et al.*, 2001).

Em peixes, DNAs satélites cromossomo específicos podem tornar-se marcadores citogenéticos úteis (SAITO *et al.*, 2007), algumas vezes utilizados para compreender as relações filogenéticas entre diferentes táxons (DE LA HERRÁN *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2007), esclarecer a citotaxonomia em complexos de espécies (MANTOVANI *et al.*, 2004; VICARI *et al.*, 2008b; KANTEK *et al.*, 2009), evidenciar as prováveis origens de cromossomos supranumerários (MESTRINER *et al.*, 2000; ZIEGLER *et al.*, 2003; JESUS *et al.*, 2003; ARTONI *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2011) e na caracterização dos cromossomos sexuais (DEVLIN *et al.*, 1998; 2001; MACHADO *et al.*, 2011; SCHEMBERGER *et al.*, 2011; PUCCI *et al.*, 2014).

Em Parodontidae, Vicente *et al.* (2003) isolaram e identificaram uma família de DNA satélite em *P. hilarii*, denominado pPh2004, constituída de 200 pb e 60% rico em bases AT. A FISH, utilizando sonda deste satélite, evidenciou 16 sítios em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z, e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W de *P. hilarii*. A sonda pPh2004 também foi localizada sobre os cromossomos de *Parodon moreirai* (CENTOFANTE *et al.*, 2002) onde foram evidenciados os mesmos sítios encontrados nos cromossomos Z e W de *P. hilarii*, além de dois pequenos sítios adicionais nos autossomos. Schemberger *et al.* (2011) realizaram um mapeamento desta sonda por FISH sobre os cromossomos das espécies *P. nasus*, *P. pongoensis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *A. ibitiensis*, *A. affinis*, *A. vladii*, *A. piracicabae* e *Apareiodon* sp. e obtiveram 10 sítios deste marcador em *P. nasus*, sendo oito sobre os autossomos e dois sobre os proto cromossomos sexuais, em *P. pongoensis* foram detectados dois sítios no par 13 (proto cromossomo sexual); *P. moreirai* apresentou dois sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW; *P. hilarii* mostrou 14 sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW e; em *A. affinis* (Alto Rio Paraná) ocorreu a presença de seis sítios sobre autossomos. As demais espécies estudadas não apresentaram marcações deste DNA satélite, inferindo-se que as espécies que possuem o DNA satélite pPh2004 divergiram mais recentemente e são mais relacionadas (BELLAFRONTTE *et al.*, 2011). Schemberger *et al.* (2011) também demonstraram que as espécies *A. affinis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis* apresentam marcações no braço longo de um par metacêntrico comparável, sendo este correspondente ao cromossomo Z das espécies com sistema de cromossomos sexuais e ao par de proto-cromossomos

sexuais nas espécies sem sistema sexual, sugerindo a origem deste DNA satélite neste par cromossômico.

Sequências de DNAs repetitivos também foram obtidas dos cromossomos sexuais por microdissecção do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (rio Verde) submetido ao bandamento C seguido de uma amplificação por PCR utilizando iniciadores degenerados (DOP-PCR – *Degenerated Oligonucleotide Primed – Polymerase Chain Reaction*) (VICARI *et al.*, 2010). Esta porção de DNA repetitivo foi denominada de *WAp* e evidenciou um arrasto em gel de agarose entre 100 e 500 pb com uma intensidade maior em 250 pb. A utilização desta sonda na FISH evidenciou sítios em regiões terminais de alguns cromossomos do cariótipo de todas as espécies da família Parodontidae estudadas (*Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*) além de marcações nos cromossomos sexuais em *A. affinis* que apresenta sistema de cromossomo sexual do tipo ZZ/ZW₁W₂ e em todas as espécies com sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (SCHEMBERGER *et al.*, 2011). As marcações da sonda *WAp* nos cromossomos Z e W das espécies com sistema ZZ/ZW corroboram com a hipótese de que houve um acúmulo de sequências repetitivas para a derivação do cromossomo W (CENTOFANTE *et al.*, 2002; VICENTE *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2006; VICARI *et al.*, 2006), sendo esta sequência não exclusiva dos cromossomos sexuais uma vez que foram detectadas também marcações em regiões terminais de vários cromossomos autossômicos do cariótipo de todas as espécies analisadas (SCHEMBERGER *et al.*, 2011).

Traldi *et al.* (2016) analisaram duas espécies de *Apareiodon* que ainda não tinham dados cromossômicos disponíveis, *A. argenteus* e *A. davisii*. Neste trabalho, quatro sequências de DNAs repetitivos foram mapeadas: DNAr 5S, DNAr 45S, *pPh2004* e *WAp*, onde *A. davisii* apresentou polimorfismo cromossômico envolvendo as duas sequências ribossomais, com variações no número e posições dos sítios, e co-localização desses genes em alguns pares de cromossomos. *WAp* apresentou disperso ao longo dos cromossomos das duas espécies e *pPh2004* foi identificado nos pares de cromossomos 7, 8, 10, 11 e 18 em *A. argenteus* e no par 24 em *A. davisii*. Assim, o estudo sugere uma possível identificação dos cromossomos correspondentes ao par proto-cromossomos sexuais, sendo o par 10 para *A. argenteus*, e o par 24 para *A. davisii*. Recentemente, do Nascimento *et al.* (2018)

localizaram *in situ* inúmeros sítios autossômicos do DNA satélite pPh2004, com diferença no número de sítios entre as populações de *A. affinis* do Rio Cuiabá e Paraguai. Assim como resultados de estudos citogenéticos tem demonstrado que os DNAs repetitivos WAp e pPh2004 são fortes marcadores evolutivos neste grupo de peixes e que estiveram envolvidos em uma intensa diversificação cariotípica com possíveis implicações nos processos de especiação em Parodontidae (ZIEMNICZAK *et al.*, 2014).

1.4 CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PARODONTIDAE

Os sistemas de cromossomos sexuais em peixes são variados, incluindo heterogametia masculina, feminina, sistemas múltiplos, além de espécies com descrição de proto cromossomos sexuais e sem heteromorfismo (GALETTI; FORESTI, 1986; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1988, 2000; MOREIRA-FILHO *et al.*, 1993; BERTOLLO *et al.*, 2000; CENTOFANTE *et al.*, 2002; PARISE-MALTEMPI *et al.*, 2007; SCHEMBERGER *et al.*, 2011). A diferenciação de um par autossômico para atingir o estado de cromossomos sexuais heteromórficos é intensa. Muller (1964) propôs que os sistemas de cromossomos sexuais têm diversas etapas de diferenciação, desde a origem onde os cromossomos X (ou Z) e o Y (ou W), por exemplo, são dificilmente distinguíveis morfológicamente, até sistemas completamente heteromórficos. Neste modelo, a degeneração do cromossomo Y (ou W) é a consequência de sua permanente heterozigosidade, sendo esta degeneração caracterizada por dois principais fenômenos: (1) a mudança de regiões eucromáticas em estrutura de heterocromatina, e (2) a erosão da atividade gênica do cromossomo heteromórfico (MULLER, 1932).

Na grande maioria dos sistemas de cromossomos sexuais ZW, o cromossomo W sofreu modificações de acúmulo de sequências repetitivas formando blocos heterocromáticos, com consequente erosão da atividade gênica (SCHEMBERGER *et al.*, 2011; PUCCI *et al.*, 2014). O sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW de Parodontidae teve origem por uma inversão paracêntrica de um sítio terminal portador da sequência repetitiva WAp para a região proximal do braço p de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta sequência levando a diferenciação do cromossomo sexual W na maioria das espécies (SCHEMBERGER *et al.*, 2011).

Nesta família os estudos citogenéticos demonstram grupos de espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos (*Apareiodon piracicabae* e *A. vittatus*); com proto cromossomos sexuais e presença de DNA satélite pPh2004 (*Parodon nasus*, *P. pongoensis*, *A. argenteus* e *A. davisii*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (*A. ibitiensis*, *A. vladii* e *A. hasemani*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. moreirai* e *P. hilarii*); além da espécie *A. affinis*, com sistema de cromossomos sexuais múltiplos e DNA satélite pPh2004 (SCHEMBERGER *et al.*, 2011; BELLAFRONTE *et al.*, 2012; TRALDI *et al.*, 2016). Análises da composição de DNA do cromossomo W demonstraram que a sequência GATAn (a qual em outros organismos foi relacionada à expressão de genes do tecido hematopoiético, às modificações da cromatina e, ao controle da expressão de genes nos cromossomos sexuais) está envolvida na diferenciação da região específica do cromossomo W (REW) de Parodontidae, e apresenta sinais dispersos e outros pontos de acúmulo nos autossomos (ZIEMNICZAK *et al.*, 2014). Schemberger *et al.* (2014) isolaram uma biblioteca Cot-1 para DNA repetitivo em Parodontidae e verificaram um intenso acúmulo de sequências repetitivas satélites e de elementos transponíveis (TEs), entre as quais, algumas foram relacionadas a degeneração molecular do cromossomo W. Com todos estes dados, foi determinado que a região pseudoautossômica (PAR) dos cromossomos sexuais é composta pelos braços longo do cromossomo Z e curto do cromossomo W, as quais possuem o DNA satélite pPh2004 no gênero *Parodon* (SCHEMBERGER *et al.*, 2014; ZIEMNICZAK *et al.*, 2014).

Na REW de Parodontidae foi verificado o acúmulo de sequências satélites e inúmeros TEs, as quais não são exclusivas dos sexuais. A expansão GATAn (ZIEMNICZAK *et al.*, 2014) e o elemento transponível Tc1-Mariner (SCHEMBERGER *et al.*, 2016) estão localizados na REW, em região intersticial. A região proximal da REW é composta pelo DNA satélite (sat1WP), na região terminal foi visualizado um extensivo acúmulo do TE helitron e, em toda sua extensão, a REW é invadida por TEs degenerados de diferentes classes (SCHEMBERGER *et al.*, 2014).

Ainda, o mapeamento *in situ* de 16 sequências microssatélites nos genomas de cinco espécies de Parodontidae demonstrou uma intensa invasão destas

sequências em regiões heterocromáticas intersticiais e, essencialmente nos cromossomos sexuais diferenciados, promovendo sua erosão genética e heterocromatização (ZIEMNICZAK, 2016). Já a sequência repetitiva TTAGGG n é componente do telômero dos vertebrados e a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) podem auxiliar no reconhecimento de alguns tipos de rearranjos cromossômicos. Em Parodontidae, até o momento nenhum ITS foi detectado (ZIEMNICZAK *et al.*, 2014). Deste modo, a diferenciação molecular e a erosão da atividade gênica do cromossomo W ocorreram por acúmulos de sequências repetitivas de diferentes tipos e classes, as quais podem formar domínios na cromatina e ter uma relação com o controle da expressão dos genes presentes nos cromossomos sexuais e determinação sexual.

1.5 DNA BARCODE

O uso de marcadores moleculares, os quais se baseiam na história evolutiva de sequências nucleares e organelares são muito utilizados na taxonomia e sistemática (PADIAL *et al.*, 2010; SCHILICK-STEINER *et al.*, 2010; TRAVENZOLI *et al.*, 2015). Isto se deve ao fato de que essas metodologias buscam diretamente a variação ao nível da molécula de DNA, o que faz com que essas abordagens permitam a análise filogenética e de fluxo gênico (TORRES *et al.*, 2004).

O *mtDNA* (DNA mitocondrial) reúne várias características que o tornam um marcador adequado para estudos evolutivos como por exemplo, sua alta taxa de evolução, a qual acredita ser 10 vezes superior à de um gene nuclear. Isso se deve a baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase mitocondrial e a alta exposição da molécula de DNA aos agentes oxidativos que são gerados durante o processo de respiração celular (BROWN *et al.*, 1979). Além disso, os genes mitocondriais não possuem íntrons (espaçadores gênicos) com raras exceções, os quais, usualmente atrapalham as análises dos segmentos de DNA, pela grande variação existente nesses segmentos. Outra característica favorável é o fato deste DNA ser haplóide, ou seja, possui apenas uma cópia do material genético em comparação ao genoma nuclear (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015).

Um dos genes utilizados para a identificação de espécies é o gene mitocondrial citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI ou COX1), proposto por

Hebert *et al.* (2003) e descrito como metodologia do DNA *barcode*, onde o fundamento básico deste método está na busca da variabilidade existente entre as sequências de DNA de um mesmo gene devido ao acúmulo de mutações ao longo da história evolutiva. Sendo assim, uma espécie poderia ser identificada por uma combinação única e exclusiva de nucleotídeos desse fragmento de aproximadamente 650 pb do gene.

O projeto DNA *Barcoding of Life* foi iniciado em 2003, com objetivo de gerar uma biblioteca de acesso global, com sequências *barcode* de referência que possibilitam identificar espécimes, visando acelerar o ritmo de descoberta de espécies, permitindo a rápida classificação de espécimes e destacando taxa divergentes que podem representar novas espécies (HEBERT *et al.*, 2003). No ano 2007 foi criado o BOLD (*Barcoding of Life Data System*), um banco de dados para a organização, análise, armazenamento e manutenção das sequências de DNA *barcode*, constituindo-se em uma plataforma de bioinformática integrada para dar suporte às fases de obtenção, análise e validação das sequências *barcode* (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

O gene COI é alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva, além disso, é bastante conservado entre os mais diversos genomas e possui diferenciação suficiente entre espécies por apresentarem padrão de sequência *barcode* espécie-específicos (TAUTZ *et al.*, 2003; WILSON, 2003; BLAXTER, 2003; SCHINDEL; MILLER, 2005; RUBINOFF, 2006). Outra característica relevante é que a variação intraespecífica é, na grande maioria dos casos, significativamente menor do que a variação genética interespecífica. Esta diferença cria um espaço, entre os valores de variação genética intra e interespecíficas, chamado de *barcode gap*, contribuindo para a diferenciação entre as espécies (HEBERT *et al.*, 2003, 2004; WAUGH, 2007; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008; WARD *et al.*, 2009). Assim, a utilização do COI é considerada vantajosa por ser suficientemente curto para ser sequenciado de forma rápida e barata, contribuindo para identificar variações entre as espécies, e tem se mostrado altamente eficaz na identificação de vários organismos (FOLMER *et al.*, 1994; REMIGIO; HEBERT, 2003; HEBERT *et al.*, 2004; BARRETT; HEBERT, 2005; HAJIBABAEI *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2009; WARD *et al.*, 2005; HUBERT *et al.*, 2008; PERSIS *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011; BELLAFRONTE *et al.*, 2013).

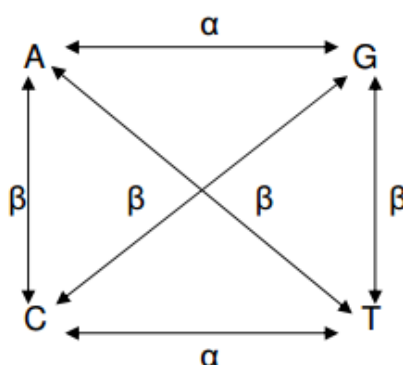
Em trabalho realizado por Bellafronte *et al.* (2013) foram analisadas sete espécies conhecidas e uma possível nova espécie de Parodontidae, coletadas em oito diferentes localidades, mostrando que a metodologia de DNA *barcode* foi eficiente na correta identificação das sete conhecidas e da possível nova espécie. Em outro estudo, seis populações de *A. affinis* (três do sistema Alto rio Paraná e três do sistema Baixo rio Paraná) foram comparadas citogeneticamente e com DNA *barcode*, onde foi evidenciado que *A. affinis* do Alto rio Paraná é um MOTU (*Molecular Operational Taxonomic Unit*) em Parodontidae, diferenciado de *A. affinis* do Baixo rio Paraná (do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Em adição, foi demonstrado que os três demes avaliados de *A. affinis* do sistema Baixo Rio Paraná (rios Uruguai, Paraguai e Cuiabá) apresentaram características citogenéticas divergentes e baixos valores de divergência genética K2P (Kimura-2-parâmetros), o que segundo os autores, poderia representar um caso de especiação cromossômica parapátrica em progresso (do NASCIMENTO *et al.*, 2018).

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

As análises da distância genética entre as populações podem ser realizadas utilizando o programa MEGA 5.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) que permite a comparação de sequências moleculares bem como a construção de árvores filogenéticas (KUMAR *et al.*, 2008). A distância genética é calculada baseada no modelo de evolução molecular K2P, sendo que este modelo apresenta um melhor desempenho quando as distâncias genéticas são baixas (KIMURA, 1980). Esta metodologia avalia a ocorrência de desigualdade entre as taxas de transição/transversão. Os dois parâmetros, α e β , permite variar não somente a taxa total de substituição por unidade de tempo, como também a fração dessas substituições que são transições e as que são transversões. Para qualquer nucleotídeo, pode haver uma troca a uma taxa α , o que causa uma transição, e a

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

FIGURA 1- ESQUEMA DO MODELO DE KIMURA-2-PARAMETER.



Os principais métodos para reconstrução de árvores filogenéticas são: Máxima Parcimônia, Distância, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. No entanto, existem dificuldades no uso dos programas de reconstrução de árvores filogenéticas: o usuário deve escolher qual método de reconstrução utilizar, conhecendo as vantagens e desvantagens de cada um (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). De maneira geral é conhecido que os métodos de distância são os mais velozes e os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana são mais exatos, mas independentemente desse fator, dentre todos os programas que existem para cada método, o usuário precisa escolher o que atenda às suas necessidades e expectativas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001).

Para análise filogenética pode ser realizada a construção de uma árvore enraizada, para determinar quão perto ou distante nossa sequência de estudo se encontra de outra conhecida. Neste tipo de árvore existe um nó particular, a raiz, para onde convergem todas as sequências, e pode ser obtida se uma ou mais unidades taxonômicas operacionais (UTO), isto é, nó terminal ou taxa, formarem um grupo externo que se acredita estarem o mais distantemente relacionado às UTO do grupo interno. O nó raiz é aquele que agrupa o grupo interno e externo representando, deste modo, o ancestral comum de ambos (FLOYD *et al.*, 2002).

Os dendrogramas são construídos a partir das sequências analisadas que apresentaram maior homologia à sequência de interesse pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). O método de NJ é empregado devido ao seu histórico de bom desempenho na análise de grandes conjuntos de dados e baseia-se no Princípio de Evolução Mínima (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967), identificando os vizinhos que sequencialmente minimizam o tamanho total da árvore (KUMAR; GADAGKAR, 2000; HEBERT *et al.*, 2003). O primeiro passo é separar o par de UTOS mais próximo (a partir dos valores da matriz de distância), separando dos outros. Este procedimento é repetido até que todos os ramos sejam encontrados (SAITOU; NEI, 1987). A análise de *bootstrap* é utilizado para medir o grau de suporte dos nós nas árvores filogenéticas, pelo alinhamento das sequências, seu valor representa o número de vezes que o agrupamento ocorreu nas replicações, e um agrupamento terá um bom suporte se ocorrer em mais de 80% das árvores (SAITOU; NEI, 1987). Em contraposição ao método de NJ, na análise bayesiana as inferências de filogenia são baseadas sobre a probabilidade posterior em árvores filogenéticas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Para muitos autores, a análise bayesiana é um método mais preciso para a interpretação das inferências filogenéticas (TORRES *et al.*, 2004).

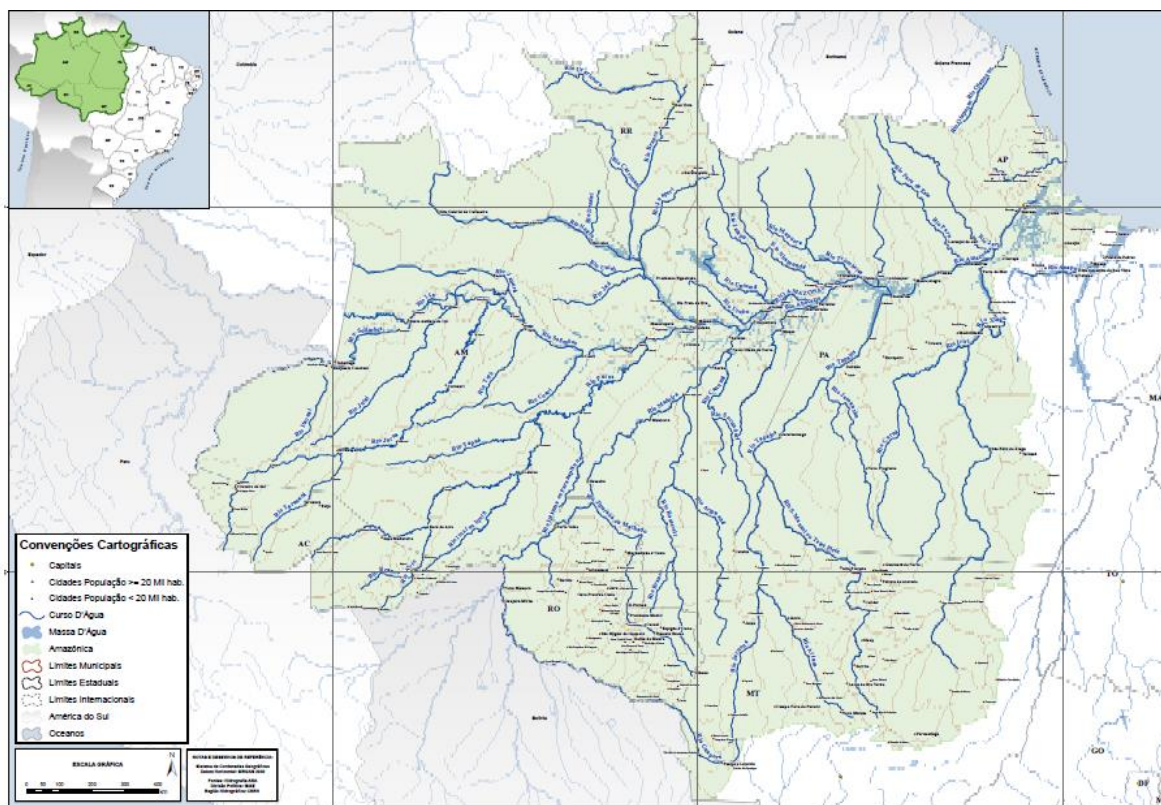
A família Parodontidae apresenta relações filogenéticas controversas em relação à taxonomia, quando consideramos apenas caracteres morfológicos (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008). Assim, a integração de estudos de número de cúspides nos dentes sinfiseanos, morfológicos de coloração corporal, citogenéticos e de sequenciamento do COI podem ser úteis na resolução destas incertezas taxonômicas, e também contribuir na definição de novas espécies ainda não descritas ou alocadas equivocadamente.

1.6 CARACTERIZAÇÃO DO RIO ARIPUANÃ

Entre as 12 Regiões Hidrográficas instituídas pela Resolução nº 32/2003 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos, encontra-se a R.H. Amazônica, que corresponde à porção brasileira da Bacia Amazônica. Esta Região Hidrográfica conta com uma área aproximada de 3.870 mil km² (45% do território nacional), abrangendo sete Estados: Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará e Mato Grosso. Dentre os seus principais rios, destaca-se: Purus, Juruá, Xingu, Solimões, Madeira, Negro e Guaporé (BRASIL, 2015).

A bacia hidrográfica do rio Aripuanã possui 146.300 km² localizados nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Rondônia, integra a bacia do rio Madeira, compondo a região sudeste da Bacia Amazônica (FIGURA 2) (BRASIL, 2011).

FIGURA 2 : REGIÃO HIDROGRÁFICA AMAZÔNICA.



FONTE: Brasil (2015)

O rio Aripuanã nasce em terras do Mato Grosso, conta com várias corredeiras e cachoeiras, sendo os principais complexos os existentes nas imediações da cidade de Aripuanã (Salto das Andorinhas, de Dardanelos, etc.), e a

Cachoeira de Sumaúma. As corredeiras existentes, de modo geral, não constituem obstáculos para a movimentação dos peixes, sendo que o complexo de cachoeiras de Dardanelos, por sua vez, representa o maior obstáculo à movimentação dos peixes na porção superior desta bacia, sendo recomendável a realização de estudos futuros para aferir as consequências ecológicas e específicas na ictiofauna do alto e baixo Aripuanã. (BRASIL, 2011)

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A família Parodontidae apresenta relações filogenéticas controversas em relação à taxonomia, isto se deve à similaridade morfológica dos representantes e a presença de poucos e sutis caracteres diagnósticos confiáveis para sustentar as monofilias dos gêneros relacionados, assim como para a diagnose de espécies (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; INGENITO, 2008).

Análises integradas de características morfológicas, citogenéticas e de genética de populações têm sido utilizados com objetivo de avaliar incertezas taxonômicas, e nesta família, alguns estudos apontam que, independentemente da aparente manutenção de características morfológicas semelhantes entre as espécies, dados citogenéticos e de distância genética demonstram uma diversidade oculta.

Neste estudo, exemplares de uma população de *Apareiodon* coletados no rio Aripuanã, na cidade de Aripuanã- Matos Grosso, semelhantes morfológicamente às espécies *Apareiodon vittatus*, *Apareiodon piracicabae* e *Apareiodon affinis* foram amostrados e dados de coloração corporal, dentes sinfiseanos, cariotípicos e de genética de populações foram obtidos para avaliar aspectos de evolução cariotípica e genética de populações.

Sendo assim, este trabalho busca contribuir com o conhecimento dos processos de diferenciação, evolução cariotípica e problemas de natureza citotaxonômica em um representante da família Parodontidae, comparado a outros representantes da família, com vistas ao entendimento da biodiversidade oculta e diferenciação cariotípica.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos morfológicos, citogenéticos, moleculares e de Barcode em um representante da família Parodontidae, comparando com outros representantes similares morfológicamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar aspectos morfológicos de coloração corporal e o número de cúspides nos dentes sinfiseanos de *Apareiodon* sp. (rio Aripuanã) de forma comparativa a outros representantes de *Apareiodon* de morfologia similar;
- Descrever com uso de técnicas citogenéticas convencionais e moleculares o cariótipo de *Apareiodon* sp. coletados no rio Aripuanã - MT;
- Comparar cariótipos de *Apareiodon* sp. do rio Aripuanã - MT com os dados citogenéticos de Parodontidae disponíveis na literatura com vistas a compreensão da diferenciação cromossômica no grupo;
- Estimar a divergência nucleotídica do gene mitocondrial Citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI) de *Apareiodon* sp. (rio Aripuanã) em relação a outros representantes de *Apareiodon* que apresentaram morfologia similar;
- Demonstrar por meio de dados de variância molecular (AMOVA), da rede haplotípica e Análise Bayesiana a estruturação das populações;
- Contribuir para o conhecimento dos processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica, bem como, auxiliar na resolução de problemas de natureza citotaxonômica em representantes de Parodontidae.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Análises morfológicas, citogenéticas e de genética de populações foram realizadas em 32 representantes da família Parodontidae, sendo 23 machos e 9 fêmeas, identificados como *Apareiodon* sp. (FIGURA 3). Os espécimes foram coletados no rio Aripuanã, na cidade de Aripuanã, estado de Mato Grosso, Brasil (10° 09' 57,8" S e 59° 26' 54,9" W) (FIGURA 4). O material cromossômico e de DNA foram obtidos do banco de preparações cromossômicas e tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. Com Licença para Coleta de Material Zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1 (ANEXO 1) e os procedimentos de uso animal em pesquisa estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Processo CEUA 029/2016 (ANEXO 2).

FIGURA 3- EXEMPLAR DE *Apareiodon* sp. (RIO ARIPUANÃ-MT).



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 4- LOCAL DE COLETA DOS EXEMPLARES, RIO ARIPUANÃ -MT.



FONTE: Adaptado de Google Maps®

3.1 ANÁLISES DA COLORAÇÃO CORPORAL, DENTES SINFISIANOS E CONTAGEM DAS CÚSPIDES

A análise da coloração corporal foi realizada por fotografias, de exemplares vivos e também fixados, onde a característica marcante analisada foi à presença de listras (horizontais) ou barras (verticais) pretas, assim como máculas.

A extração e análise dos dentes sinfisianos foi realizada seguindo a metodologia descrita em do Nascimento *et al.* (2018), onde com auxílio de estereomicroscópio e uma agulha hipodérmica foram retirados os dentes sinfisianos dos exemplares de Parodontidae em análise. Cada dente foi colocado em lâmina escavada contendo Hipoclorito de Sódio 2,5%. A seguir transferidos para outra cavidade da lâmina contendo Peróxido de Hidrogênio em solução 10%, permanecendo por três minutos. Posteriormente, os dentes foram armazenados em álcool 70 v/v por 10 dias. Os dentes foram fotografados em microscópio de campo claro (Olympus BX41) acoplado em câmera CCD DP72 (Olympus) em aumento 40x para posterior contagem do número de cúspides.

3.2 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

3.2.1 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS

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 centrifuga e mantida em temperatura ambiente (26-28°C) por 30 minutos. Após a incubação, 2 mL 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 ao laboratório, onde foram submetidos a fixações, conforme descrito por Bertollo *et al.* (2015) (ANEXO 4).

Para confecção de lâminas foram gotejados 150 microlitros da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. Para isto, a lâmina deve estar limpa, levemente inclinada, com uma fina película de água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material permaneça aderido sobre a lâmina. O material então foi seco ao ar e corado com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 por cerca de 8 minutos.

3.2.2 BANDAMENTO C

A detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada de acordo com a técnica descrita por Sumner (1972), em amostras de machos e fêmeas que apresentaram metáfases integras. Este procedimento permite a observação de regiões específicas em que o cromossomo apresenta DNA altamente repetitivo e, por isso, são detectadas regiões mais escuras nos cromossomos correspondentes às regiões condensadas. Assim, as lâminas contendo o material celular são tratadas com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Incubadas a 28°C em solução de bário (Ba (OH)₂) durante 1 a 2 minutos. Depois as lâminas são submergidas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavadas com água destilada. O material é imerso em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavado em água destilada e seco ao ar. As lâminas são coradas com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

3.3 SÍNTESE DE SONDAS E LOCALIZAÇÃO *IN SITU*

Foram empregados cinco tipos de sondas, em amostras de machos e fêmeas, para a localização dessas sequências nos cromossomos metafásicos de *Apareiodon* sp. Duas destas sequências de DNA foram isoladas por PCR a partir do genoma total de um indivíduo de *Apareiodon* sp.: o DNAr 5S de acordo com o procedimento descrito por Barros *et al.* (2017) (ANEXO 5) e o DNAr 18S de acordo com o procedimento descrito por Gross *et al.* (2010) (ANEXO 6). Além destas, foram utilizadas as sondas do DNA satélite de *Parodon hilarii* denominada pPh2004 (VICENTE *et al.*, 2003); a fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon*

sp. (rio Verde), denominada WAp (VICARI *et al.*, 2010); e a sonda do microsatélite (GATA)*n* obtida de acordo com o descrito por Traldi *et al.* (2013) (ANEXO 7).

As sequências do DNAr 18S e (GATA)*n* foram marcadas como sondas utilizando o hapteno digoxigenina-11-dUTP (*Jena*) e as sequências do DNAr 5S, *pPh2004* e WAp foram marcadas utilizando o hapteno biotina-16-dUTP (*Roche Applied Science*). O protocolo geral da FISH utilizado foi sob alta condição de estringência (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h) e seguiu o procedimento descrito em Pinkel *et al.* (1986) (ANEXO 8). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina Alexa Fluor 488 conjugada (*Molecular Probes*) e Anti-digoxigenina conjugada com Rodamina (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 μg/mL) em meio de montagem Vectashield (*Vector*), e analisados em microscópio de epifluorescência.

3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS CITOGENÉTICOS

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Lab 1 acoplado ao software Zen Lite em Câmera Zeiss AxioCam ICM1 e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software *Adobe Photoshop®* versão CS6, e organizados em pares de homólogos e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan *et al.* (1964).

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), de cinco amostras de machos e fêmeas, utilizando o protocolo adaptado de Doyle; Doyle (1990), retirando um pequeno pedaço 15 mm³ do fígado ou músculo do animal e colocado em um microtubo; adiciona-se 360 μl de tampão (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M) sem CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio); acrescenta-se 13 μl de proteinase K (10mg/mL), 5 μl de β-

mercaptoetanol e 240 µl de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 5% cristalizado, posteriormente incuba-se em banho-maria a 55°C, overnight ou até digerir totalmente o tecido. Após este período adiciona-se 600 µl de clorofórmio e agita-se por 5 minutos em vortex suave, em seguida centrifuga a 8000 rpm por 5 minutos e retira o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo; adiciona-se 600 µl de etanol absoluto e armazena a – 20 °C por 2 horas ou overnight. Posteriormente centrifuga-se a 14.000 rpm por 15 minutos e descarta o sobrenadante, deixando somente o pellet. Em seguida lava-se o pellet com 500 µl de etanol a 70 v/v, sem agitar. Centrifuga-se por 2 minutos a 14.000 rpm e retira o sobrenadante. Armazenar em estufa a 37°C. Posteriormente, adicionar 5µl de RNase e colocar 1 hora na estufa a 37°C. Em seguida inativar a RNase a 65°C por 15 minutos e armazenar no freezer.

3.6 OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS COI

A partir da extração do DNA genômico, amostras foram utilizadas para a amplificação por PCR da região *barcode* do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I (COI). A reação de amplificação da sequência COI foi realizada com a utilização dos primers denominados de *Fish F1* e *Fish R1* (WARD *et al.*, 2005). A reação foi composta por 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM primers e 100 ng/mL de DNA molde. O programa da reação foi: desnaturação inicial por 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52°C por 40 s, 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, as amostras foram purificadas (ANEXO 9) e submetidas ao sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares (disponibilizado pela empresa Ludwig Biotec), utilizando-se o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*).

Foram obtidas seis sequências COI de *Apareiodon* sp. (rio Aripuanã), seis sequências COI de *Apareiodon vittatus* (rio Jangada) e, a partir do Genbank sequências de *Apareiodon piracicabae* (rio Passa Cinco), *Apareiodon affinis* (rio Cuiabá), *Apareiodon affinis* (rio Passa Cinco). Todas as sequências foram inicialmente analisadas com o software Geneious 8.1.9 (KEARSE *et al.*, 2012). As sequências foram então alinhadas usando o algoritmo Clustal W implementado no Geneious, onde foram checados possíveis erros no sequenciamento comparando

com os dados já depositados no GenBank (NCBI) através da ferramenta BLAST. Para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado o software MEGA 7.0.14 (KUMAR *et al.*, 2016), utilizando o modelo de evolução de Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Para a análise de fluxo gênico e diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foi utilizado o software DnaSP (LIBRADO; ROZAZ, 2009) e para a análise da estruturação populacional e análise molecular de variância (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) foi utilizado o software Arlequin 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISHCER, 2010). Utilizando o programa PopArt 1.7 foram geradas redes de haplótipos através do critério de *median joining* (LEIGH; BRYANT, 2015). As análises de estruturação foram realizadas através das atribuições de cada indivíduo às populações utilizando inferência bayesiana, usando os softwares Structure 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000) e *Bayesian Analysis of Population Structure* - BAPS 6 (CORANDER *et al.*, 2004; CORANDER; MARTTINEN, 2006). A árvore de inferência bayesiana foi gerada com o programa MrBayes 3.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão foram alocados em um capítulo correspondente ao artigo científico.

4.1 CAPÍTULO 1:

CYTOGENETICS AND POPULATION GENETICS REVEAL AN UNDESCRIBED
APAREIODON SPECIES (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Submetido e em avaliação no periódico *Genetics and Molecular Biology*

**CYTOGENETICS AND POPULATION GENETICS REVEAL AN UNDESCRIBED
Apareiodon SPECIES (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)**

Emanoel Oliveira dos Santos¹, Geize Aparecida Deon², Rafael Bonfim de Almeida¹, Ezequiel Aguiar de Oliveira³, Viviane Nogaroto², Hugmar Pains da Silva⁴, Carla Simone Pavanelli⁵, Marta Margarete Cestari¹, Luiz Antonio Carlos Bertollo³, Orlando Moreira-Filho³, Marcelo Ricardo Vicari^{1,2*}

¹ Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Caixa-Postal: 19071, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

⁴ Laboratório de Citogenética e Genética Animal (Labgen), Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, 2367, 78060-900. Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

⁵ Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Tel.: +55 42 3220-3739; Fax: +55 42 3220-3102; e-mail: vicarimr@uepg.br

Running Title: Undescribed species in *Apareiodon*

Abstract

Parodontidae currently composed of three genera, *Apareiodon*, *Parodon* and *Saccodon*, and harbors 32 valid species. We evaluate data on color, teeth morphology, cytogenetics and mitochondrial markers (COI) in *Apareiodon* specimens from the Aripuanã River (Mato Grosso State, Brazil) and the results were compared to other congeneric taxa. Morphological results were similar to some other known *Apareiodon*, especially *Apareiodon vittatus* Garavello, 1977, *Apareiodon piracicabae* (Eigenmann, 1907) and *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879). The diploid number of 54 chromosomes and karyotype formula (50 m/sm + 4 st; FN = 108) in both sexes were also found to be common to other species of the genus. However, heteromorphic chromosomes comprising a ZZ/ZW sex chromosome system was diagnosed for this species. Concerning the evaluated chromosomal markers, the 5S rDNA site was localized in a single chromosome pair, the 18S rDNA was localized in five chromosome pairs and accumulation of the pPh 2004 satellite DNA was detected in several chromosomes. In addition, the GATAn microsatellite evidenced few autosomal signals and the WAp probe was localized in the sex chromosomes. Our phylogenetic tree and population genetics data revealed well-supported clades and confirmed, by barcode species delimitation analysis, a Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) for *Apareiodon* sp. from the Aripuanã River. The chromosomal data were also unique for this species in comparison to other congeners. As a whole, the above features support the occurrence of a new species of the *Apareiodon* genus, thus far unknown for the Parodontidae family.

Keywords: chromosomal differentiation, hidden diversity, repetitive DNAs, sex chromosomes.

Introduction

The Parodontidae is currently composed of three genera: *Apareiodon* Eigenmann, 1916; *Parodon* Valenciennes, 1849 and *Saccodon* Kner, 1863 (Pavanelli, 2003), with 32 valid species (Eschmeyer and Fong, 2017). Its species can be differentiated from the other Characiformes by the combined features: an edentulous lower jaw in the anterior region and spatulate mandible, pedunculated and multicuspid premaxillary teeth with wide distal border, distributed in a single series, and by the absence of upper lip and fontanelle (Pavanelli, 2003). The genera are mainly characterized by variation in the number of undivided rays in the pectoral fins however, the color pattern with one regular black longitudinal stripe or several vertical bands, in addition to the shape and number of the tooth cusps adjacent to the premaxillary symphyseal tooth, can also be used in the species identification (Pavanelli, 2003).

Cytogenetic analyzes in Parodontidae revealed a conserved diploid number of 54 chromosomes, most of them meta/submetacentric, with few or none subtelocentric chromosome (Moreira-Filho *et al.*, 1980; Jesus and Moreira-Filho, 2000; Rosa *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006). Acrocentric chromosomes are an exception, only found in *Apareiodon affinis* of the lower Paraná River system (Jorge and Moreira-Filho, 2000, 2004; do Nascimento *et al.*, 2018). Differences in karyotypes, such as distinct karyotypic formulas, number and localization of the satellite DNA pPh2004 and 18S and 5S rDNA sites, distribution of the heterochromatic bands and occurrence of sex chromosomes (Moreira-Filho *et al.*, 1984; 1985; Bellafrente *et al.*, 2011; 2012; Schemberger *et al.*, 2011, 2014, 2016; Ziemniczak *et al.*, 2014), appear as exclusive derived species features.

However, one of the most outstanding cytogenetic characteristic in the differentiation of Parodontidae species is the occurrence of sex chromosome systems. This way, besides species without heteromorphic sex chromosomes and with proto-sex ones, heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes and multiple sex system of the ZZ/ZW₁W₂ type also occur (Schemberger *et al.*, 2011). Heterocromatization is commonly associated to the morphological differentiation of the W chromosome (Centofante *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2003; Vicari *et al.*, 2006; Schemberger *et al.*, 2011; Bellafronte *et al.*, 2012). Accumulation of satellite sequences and transposable elements (TEs) were responsible events for molecular differentiation and erosion of the W chromosome gene activity, allowing the identification of pseudo-autosomal (PAR) and W specific (WSR) regions in Parodontidae (Schemberger *et al.*, 2014; Ziemniczak *et al.*, 2014). In addition, repetitive sequences also promoted the differentiation among autosomes, acting on the karyotypic diversification of this group (Bellafronte *et al.*, 2011; Schemberger *et al.*, 2011, 2014, 2016; Ziemniczak *et al.*, 2014; Traldi *et al.*, 2016; do Nascimento *et al.*, 2018).

Integrative cytogenetic and population genetics studies were effective in detecting chromosome evolution and species richness within supposedly homogeneous taxa of *Apareiodon affinis* (do Nascimento *et al.*, 2018). Indeed, molecular analysis contributes to reveal a hidden biodiversity (Cunha *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2017; do Nascimento *et al.*, 2018) and has been widely used for identification and delimitation of neotropical fish species (Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011, 2013; Ramirez and Galetti Jr., 2015; Machado *et al.*, 2016). In this sense, one of the most used genes for species identification is the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, which was proposed by Hebert *et al.*

(2003), as a DNA barcode methodology. Thus, DNA barcode and population genetics can be used to define discrete genetic lineages, characterizing Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) and/or revealing reciprocal monophyly (Floyd *et al.*, 2002).

In this study, it was used morphological patterns, chromosomal markers, DNA barcode and population genetics with the objective of identifying a probable undescribed *Apareiodon* species from the Aripuanã River, Mato Grosso State, Brazil, here named as *Apareiodon* sp., in addition to discuss the chromosomal evolution and species diversification inside the Parodontidae family.

Material and methods

Biological sample

Chromosome studies were performed on 32 specimens (23 males and 9 females) of *Apareiodon* sp., collected in the Aripuanã River, Amazon basin (10°09'57.8"S and 59°26'54.9" W). The chromosomal and DNA material were obtained from the Laboratory of Fish Cytogenetics of the Universidade Federal de São Carlos. The procedures were in agreement with the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocol: 29/2016). The specimens were identified based mainly on a black band on the third distal edge of the dorsal fin, but also on the combination of other morphological features, such as a black lateral band without up and downwards projections, two maxillary teeth, premaxillary teeth with a rounded cutting edge and 9 to 11 cusps, among others. Voucher specimens were deposited at the Coleção Ictiológica of Núcleo de

Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) of Universidade Estadual de Maringá (NUP 19988).

Analysis of body color, symphysial and cusps teeth

Body color analysis was performed with live and fixed specimens in order to ascertain the presence of the black dorsal-fin band. Also an extraction and analysis of the symphysial teeth were performed following do Nascimento *et al.* (2018). Teeth were photographed by a bright-field microscope (Olympus BX43) coupled to a DP72 CCD camera (Olympus) in 40x magnification for further counting of the cusps number.

Chromosomal preparations

Mitotic chromosomes were obtained according to Bertollo *et al.* (2015). The chromosomal preparations were submitted to conventional Giemsa staining and C-banding procedures (Sumner, 1972) to determine the diploid number (2n), chromosomal formula, fundamental number (FN) and to characterize sex chromosomes.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) followed Pinkel *et al.* (1986). Five types of probes were used to localize their complementary sequences in the metaphase chromosomes of *Apareiodon* sp. The following two sequences were isolated by PCR from the total genome of *Apareiodon* sp, according to the respective authors: 5S rDNA (Barros *et al.*, 2017), 18S rDNA (Gross *et al.*, 2010). In addition, the *Parodon hilarii* satellite DNA probes named pPh 2004 (Vicente *et al.*, 2003), the

heterochromatic fraction of the W chromosome of *Apareiodon* sp., named *WAp* (Vicari *et al.*, 2010) and the (GATA)_n microsatellite probe (Traldi *et al.*, 2013), were also used.

18S rDNA and (GATA)_n probes were labeled using digoxigenin-11-dUTP hapten (Jena), while 5S rDNA, *pPh* 2004 and *WAp* were labeled using biotin-16 - dUTP hapten (Roche Applied Science). The general protocol for FISH procedure was followed under high stringency condition (2.5 ng/μl probe, 50 % formamide, 2xSSC, 10 % dextran sulfate, 37 °C for 16 h). Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and Anti-digoxigenin rhodamine fab fragments (Roche Applied Science) antibodies were used for probes detection. The chromosomes were stained with DAPI (0.2 μg/mL) in Vectashield mounting medium (Vector) and analyzed under epifluorescence microscopy.

After capture, images were edited and arranged into karyotypes using Adobe Photoshop software CC 2015. Homologous chromosomes were paired and arranged in metacentric-submetacentric (m/sm) and subtelocentric (st) groups, according to Levan *et al.* (1964). Two arms were considered for each one of such chromosome types to determine the fundamental number (NF).

Molecular analysis

For genomic DNA extraction liver samples were used following CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) method of Murray and Thompson (1980). DNA samples were used to amplify the barcode region of the mitochondrial gene *Cytochrome C oxidase subunit I* (COI) by PCR. The amplification reaction of the COI sequence was performed using the primers called *Fish F1* and *Fish R1* (Ward *et al.*, 2005). Reaction was composed by 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500

mM KCl), 40 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 μ M *primers* and 100 ng of DNA template. It was used the following reaction program: initial denaturation for 2 min at 94 °C; 35 cycles of 94 °C for 1 min, 52 °C for 40 s, 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 10 min. After amplification, the samples were purified and submitted to nucleotide sequencing using the ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

COI sequences were obtained for *Apareiodon* sp. from the Aripuanã River and of *Apareiodon vittatus* (Jangada River) GeneBank (access numbers: MG827218 - MG827229). Additionally, COI sequences of *Apareiodon piracicabae* (Passa Cinco River), *Apareiodon affinis* (Cuiabá River) and *Apareiodon affinis* (Passa Cinco River) described by Bellafronte *et al.* (2013), were also used. All sequences were first analyzed with Geneious 8.1.9 software (Kearse *et al.*, 2012), and aligned using ClustalW algorithm, where possible sequencing errors were checked against the data already deposited in GenBank (NCBI) through the BLAST tool. For the Calculations of genetic distances were obtained by using the MEGA software 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016), and the Kimura-2-Parameters (K2P) evolution model (Kimura, 1980). Gene flow, haplotype (h) and nucleotide (π) diversity analyses were performed by DnaSP software (Librado and Rozas, 2009). Population structuring and analysis of molecular variance - AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), were performed by the Arlequin 3.5.2.2 software (Excoffier and Lischer, 2010). PopArt 1.7 program generated a haplotype network through median joining criterion (Leigh and Bryant, 2015). Structural analysis was performed by assignments of each individual to the populations using Bayesian inference in Structure 2.3.4 software (Pritchard *et al.*, 2000) and Bayesian Analysis of Population Structure - BAPS 6 (Corander *et al.*, 2004; Corander and Marttinen,

2006). The Bayesian inference tree was generated with the MrBayes 3.2 program (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

Results

The *Apareiodon* sp. individuals show a regular black longitudinal stripe extending from head to axial and the flippers have a yellowish tone (pectoral, dorsal, caudal) and the end of the blackened ridge (Fig. 1a). The symphyseal teeth showed rounded edges, bearing 9 to 11 cusps (Fig. 1b).

All specimens have $2n=54$ chromosomes, $FN=108$, with 50 m/sm + 4st for both sexes. However, the 13th pair appears heteromorphic in females, revealing a ZZ/ZW sex chromosome system (Fig. 2). Both Z and W chromosomes are metacentric in form, but the W one being much larger in size, corresponding to the second largest chromosome of the complement (Fig. 2). The heterochromatin bands are mainly pericentromeric, in addition to some additional terminal bands (Fig. 2b, d). While the Z chromosome presents only a small proximal heterochromatic band in the short arm, the W chromosome has most of its long arm heterochromatic (Fig. 2b, d).

FISH analysis with the 5S rDNA probe showed that this multigene family is localized in the p arm of pair 6 (Fig. 3a). The *in situ* localization of 18S rDNA evidenced ten terminal clusters in pairs 2, 5, 9, 26 and 27, all in the long arms with exception of the pair 26 (Fig. 3b). The satellite DNA *pPh* 2004 is clustered in the terminal region of pairs 3, 5, 6 and, 11, in addition to ZW sex chromosomes, as well as the GATAn sequence although not in the same chromosome pairs and neither in the Z and W chromosomes (Fig. 3c). In addition, the heterochromatic *WAp* probe is also localized in the proximal region of the q arm of the Z chromosome and in a great extend of the q arm of the W chromosome (Fig. 3d).

Molecular analysis

Twenty-six fragments of the COI gene from different *Apareiodon* individuals were analyzed. The sequences did not show insertions, deletions, stop codons or sequencing errors. The sequences contained 706 nucleotides, with 183 variable sites, with a nucleotide diversity $\pi = 0,13475$. The haplotype number considered was 16 with a haplotype diversity $h = 0,93231$.

Genetic divergences K2P among species ranged from 6.0 to 23.4 % and, when considered only *Apareiodon* sp. (Aripuanã River) in comparison to the other *Apareiodon* species, the K2P genetic distance was 20.6 to 23.4 % (Table I). The neighbour joining tree revealed five main consistent branches: *Apareiodon* sp. (Aripuanã River), *A. vittatus*, *A. piracicabae*, *A. affinis* (Cuiabá River), *A. affinis* (Passa Cinco River) (Fig. 4). The maximum likelihood tree and Bayesian analysis considering the substitution TIM2+G model (Posada, 2003) given by Jmodeltest, revealed the same five main consistent branches (Fig. 5). *Leporinus piau* was used as out-group in the tree and demonstrated the ancestral relationship with all species analyzed in-group.

The barcode sequences of the *Apareiodon* species analyzed were also used for the haplotype network construction. This network showed that there is no haplotype overlap among the species and that the haplotypes of a same species are more closely related to each other when compared with others (Fig. 6a). AMOVA analysis provided values of $\Phi_{ST} = 0,69829$. Regarding populational structuration inference, the analysis generated by BAPS indicated that there is no sequence overlap, thus evidencing independent groups (Fig. 6b).

Discussion

Parodontids are mostly rheophilic, therefore absent in the lower regions of the Amazon basin. However, the *Apareiodon* species from the upland rivers of the Amazon basin are morphologically less similar to *Apareiodon* sp. from the Aripuanã River than to congeners from the La Plata basin. Morphological data and body color of *Apareiodon* sp. showed relatively similar patterns to *Apareiodon* species from the Paraná-Paraguai system (*A. vittatus*, *A. piracicabae* and *A. affinis*), except for the black stripe at the dorsal fin. In addition, the teeth shape and the number of cusps have also similarities to those of *A. piracicabae*, from the upper Paraná and upper São Francisco basins (Pavanelli, 2006).

Nevertheless, cytogenetic and population genetics data show a clear speciation scenario. Although having diploid number, chromosomal formula, FN value and localization of 5S rDNA sequences similar to other species of the genus (Bellafronte *et al.*, 2011; Schemberger *et al.*, 2011; Traldi *et al.*, 2016), a set of chromosomal markers including the distribution of 18S rDNA sites, satellite DNA pPh 2004 and repetitive sequences in the sex chromosomes, especially in the W one, were able to differentiate *Apareiodon* sp. from others congeneric species. The 18S rDNA sites occupies the long arm terminal region of a single large subtelocentric chromosome pair in most species of *Apareiodon* (Moreira-Filho *et al.*, 1984, 1985; Rosa *et al.* 2006; Vicari *et al.*, 2006). In contrast, *Apareiodon* sp. shows the exclusive number of five chromosomes pairs bearing such major rDNA sequences among the Parodontidae species. Some few exceptions for multiple 18S rDNA sites occur in *Apareiodon* (Bellafronte *et al.*, 2009; Traldi *et al.*, 2016), but in neither case it is found a high number as those of *Apareiodon* sp., which may be related to some distinct

chromosomal rearrangements, such as inversions, translocations and transposon-mediated transpositions (Symonová *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2017).

The 5S rDNA location is also a conserved trait in the Parodontidae family, where the chromosome pair bearing these sequences appears as homeologue in most species (Bellafronte *et al.*, 2009, 2011). Additional 5S rDNA sites is a rare occurrence, and only *Parodon nasus* and *A. affinis* showed this site at a different chromosome and position (Bellafronte *et al.*, 2009; Traldi *et al.*, 2016; do Nascimento *et al.*, 2018).

It was proposed that the differentiation of the ZZ/ZW sex system in Parodontidae takes into account a paracentric inversion, in which the terminal WAp repetitive sequence was transposed to the proximal region of the short arm of a metacentric pair, with subsequent amplification leading to the differentiation of the W chromosome (Centofante *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2003; Schemberger *et al.*, 2011). Apparently, only *A. hasemani* presents a distinct stage of heterochromatinization on the p arm (Bellafronte *et al.* 2012). In *Parodon moreirai* and *Parodon hilarii*, the Z chromosome presents satellite DNA at the terminal region of the q arm, while the W chromosome has pPh2004 in the PRA (pseudo-autosomal region located at p arm), and WAp and GATAn sequences at the WSR (W specific region located at q arm). The differentiation of the W chromosome of *Apareiodon* sp. differs by the exclusive localization of the satellite pPh2004 in the q arm. However, the WSR of *Apareiodon* sp. keeps its repetitive sequences concerning to the WAp probe identical to others Parodontidae, with the exception of the GATAn expansion which has no accumulation in this chromosome.

In addition to the unique characteristics of the W chromosome, the high number of pPh 2004 sites dispersed through the *Apareiodon* sp. karyotype was described for *P. nasus*, *P. hilarii* and *A. affinis* (Centofante *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2003; do Nascimento *et al.*, 2018), thus promoting another particular chromosomal differentiation of this species inside the *Apareiodon* genus. All these cytogenetic features corroborate with barcode and population genetics data, which demonstrate differentiation and absence of gene flow between *Apareiodon* sp. and other *Apareiodon* species with similar body color pattern.

DNA barcode studies have been useful in demonstrating genetic divergence among Parodontidae species, such as *A. affinis*, *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp. from Verde River, *P. nasus* and *P. moreirai* (Bellafronte *et al.*, 2013), all well morphologically supported clades. The comparative population studies of *A. affinis* were equally resolute, evidencing that the species from the upper Paraná differ from those of the lower Paraná River basin, and that three populations from the lower Paraná system (Uruguai, Paraguai and Cuiabá rivers) display divergent chromosomal features, as well as low values of genetic divergence, which could indicate possible parapatric speciation processes in progress (do Nascimento *et al.*, 2018). In our study, *Apareiodon* sp. represents only Amazon species that was compared to other *Apareiodon* sharing similar color pattern (*A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*), all of them from the Paraná River basin.

According to Lundberg *et al.* (1998), the modern separation between the Paraná and Amazon systems occurred about 30 Myr ago. Meantime, headwater captures among rivers from these hydrographic systems were also documented during the last 10 Myr (Lundberg *et al.*, 1998). The results of K2P genetic divergence

demonstrated that *Apareiodon* sp. is distant 20-23 % from other *Apareiodon* evaluated, these high K2P values being compatible with distinct fish species (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005, 2009). Thus, although probable fauna interchanges between the Paraná and Amazon systems, the population structuration analysis in addition to K2P genetic divergence evidenced that *Apareiodon* sp. appears as distinct biological entity inside Parodontidae. Within the Amazon basin itself, *Apareiodon* sp. seems to be morphologically different from congeners and apparently it is not found outside the Madeira River basin.

Our phylogenetic analyses showed that specimens, although morphologically similar, compose particular groups in distinct branches with high support values, indicating clades that have already ancient segregations. The closest relationship of *Apareiodon* sp. and *Apareiodon affinis*, from the Paraná-Paraguai system, indicates some current or recent connections between the basins, corroborating Brea and Zucol (2011) and Dagosta and De Pinna (2017). In this scenario, population genetics data, in addition to particular cytogenetic characteristics, testify that *Apareiodon* sp. from the Aripuanã River differentiated from morphologically close congeneric species and appears as a Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) inside the Parodontidae family.

Acknowledgments

The authors are grateful to ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (license number 10538-1 to collect specimens) and to Luis Henrique da Silva for technical support. This study was supported by Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e

Tecnológico do Estado do Paraná), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Fapemat (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Barbosa P, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF and Vicari MR (2017) Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. *Neotrop Ichthyol* 15:e160056.
- Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O and Vicari MR (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608:20-27.
- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP and Moreira-Filho O (2009) Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. *J Fish Biol* 75:2313-2325.
- Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, Margarido VP and Vicari MR (2011) Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. *Rev Fish Biol Fish* 21:559-570.
- Bellafronte E, Schemberger MO, Artoni RF, Moreira-Filho O and Vicari MR (2012) Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. *Genet Mol Biol* 35:770–776.

- Bellafronte E, Mariguela TC, Pereira LHG, Oliveira C and Moreira-Filho O (2013) DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata River basin applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotrop Ichthyol* 11:497-506.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O and Cioffi MB (2015) Direct chromosome preparations from freshwater teleost fishes. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (eds) *Fish techniques, Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. CRC Press, Boca Raton, pp 21–26.
- Brea M and Zucol AF (2011) The Paraná-Paraguay Basin: geology and paleoenvironments. In: Albert JS and Reis RE (eds) *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press, Berkeley, pp 69–87.
- Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C and Hanner R (2011) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22:80–86.
- Centofante L, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2002) ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 54:139–150.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P and Sillanpää MJ (2004) BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20:2363–2369.
- Corander J and Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Mol Ecol* 15:2833-2843.
- Cunha WT, Santos RC, Araripe J, Sampaio I, Schneider H and Rêgo PS (2017) Molecular analyses reveal the occurrence of three new sympatric lineages of

- velvet worms (Onychophora: Peripatidae) in the eastern Amazon basin. *Genet Mol Biol* 40:147-152.
- Dagosta FCP and de Pinna M (2017) Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotrop Ichthyol* 15:e170034.
- do Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L, Pavanelli CS, Torres RA, Moreira-Filho O and Vicari MR (2018) Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? *Zool Anz* 272:93–103.
- Eschmeyer WN and Fong JD (2017) Species by family/subfamily. In: Eschmeyer WN (Ed). *Catalog of fishes*. California, California Academy of Sciences. Online version. Available from:<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (accessed april 2017).
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L and Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567.
- Floyd R, Eyualem A, Papert A and Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol* 11:839–850.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C and Feldberg E (2010) Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *J Fish Biol* 76:1117-1127.

- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL and Dewaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270:313–321.
- Huelsenbeck JP and Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Jesus CM and Moreira-Filho O (2000) Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia* 65:397–402.
- Jorge LC and Moreira-Filho O (2000) Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: sex chromosomes and polymorphism. *Genetica* 109:267–273.
- Jorge LC and Moreira-Filho O (2004) Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 57:203-207.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, *et al.* (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.
- Kimura M (1980) A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- Kumar S, Glen Stecher G and Tamura K (2016) Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874.
- Leigh JW and Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Meth Ecol Evol* 6:1110–1116.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lundberg JG (1998) The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: Reis RE, Vari RP, Lucena ZM and Lucena CAS (eds) *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, pp 13–48.
- Machado CDB, Ishizuka TK, Freitas PD, de Valiati VH and Galetti PM (2016) DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). *Syst Biodivers* 15:372–382.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr. PM (1980) Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 33:83-91.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr. PM (1984) Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *J Genet Cytol* 26:564–568.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr. PM (1985) Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces-Cypriniformes). *Caryologia* 38:47-55.
- Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4325.
- Pavanelli CS and Britski HA (2003) *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with description of three new species. *Copeia* 2:337–348.
- Pavanelli CS (2006) New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the rio Piquiri, upper rio Paraná basin, Brazil. *Copeia* 2006:89-95.

- Pereira LHG, Maia GMG, Hanner R, Foresti F and Oliveira C (2011) DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* 22:71–79.
- Pereira LHG, Hanner R, Foresti F and Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet* 14:20.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Posada D (2003) Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Prot Bioinformatics* 6:5.
- Ramirez JL and Galetti Jr. PM (2015) DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Mol Phylog Evol* 93:77–82.
- Ramirez JL, Birindelli JL, Carvalho DC, Affonso PRAM, Venere PC, Ortega H, Carrillo-Avila M, Rodríguez-Pulido JA and Galetti Jr. PM (2017) Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Front Genet* 8:149.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.

- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O and Margarido VP (2006) Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). *Genetica* 128:159–166.
- Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RF, Moreira-Filho O and Vicari MR (2011) Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* 139:1499-1508.
- Schemberger MO, Oliveira JIN, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Cestari MM, Moreira-Filho O and Vicari MR (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* 11:518-527.
- Schemberger MO, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Valente GT, Martins C and Vicari MR (2016) Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593:308–314.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M and 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 Evol Biol* 13:42.

- Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JDEF, Lui RL, Artoni RF and Moreira-Filho O (2013) Physical mapping of (GATA)*n* and (TTAGGG)*n* sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *J Genet* 92:127-130.
- Traldi JB, Vicari MR, Martinez JDF, Blanco DR, Lui RL and Moreira-Filho O (2016) Chromosome analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisii* (Characiformes, Parodontidae): An extensive chromosomal polymorphism of 45S and 5S ribosomal DNAs. *Zebrafish* 13:19-25.
- Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF and Bertollo LAC (2006) ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenet Genome Res* 114:163-168.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116.
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR and 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 RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR and Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1847-1857.
- Ward RD, Hanner R and Hebert PDN (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol* 74:329–356.
- Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O and Vicari MR (2014) In situ localization of (GATA)*n* and (TTAGGG)*n* repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 144:325–332.

TABLE I. ESTIMATES OF EVOLUTIONARY DIVERGENCE OVER SEQUENCE PAIRS AMONG GROUPS.

Species	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
(a) <i>Apareiodon</i> sp. (Aripuanã river)		0,020	0,021	0,020	0,022
(b) <i>Apareiodon vittatus</i>	0,217		0,023	0,020	0,016
(c) <i>Apareiodon affinis</i> (Cuiabá river)	0,215	0,229		0,012	0,015
(d) <i>Apareiodon affinis</i> (Passa Cinco river)	0,206	0,206	0,060		0,013
(e) <i>Apareiodon piracicabae</i>	0,234	0,151	0,099	0,077	

The number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs between groups are shown. Standard error estimate(s) are shown above the diagonal. Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter model. The analysis involved 26 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 441 positions in the final dataset.

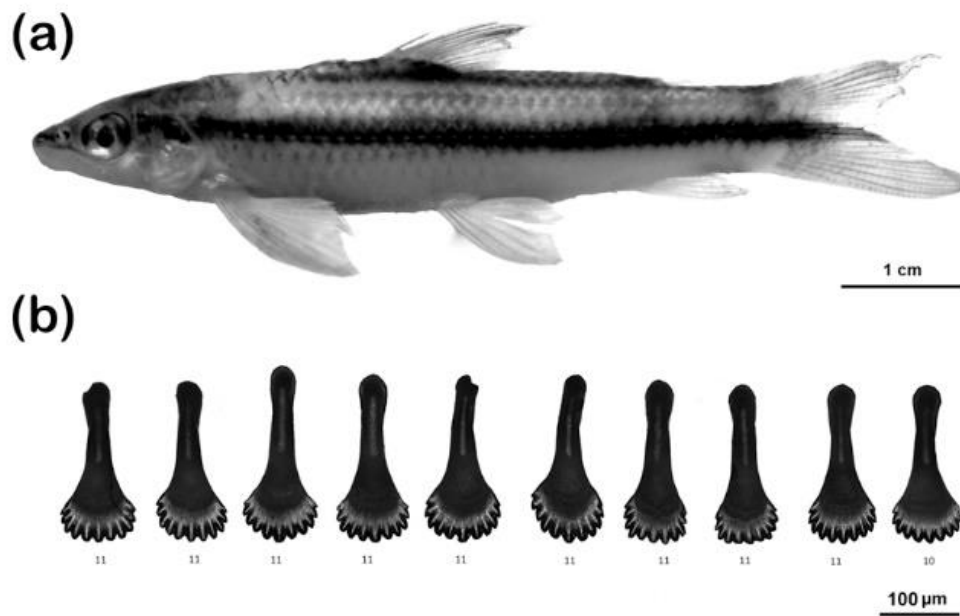


FIGURE 1. PHOTOGRAPHY OF THE *APAREIODON* SP. FROM THE ARIPUANÃ RIVER (A). SYMPHESIAN TEETH IMAGES SHOWING THE TOOTH MORPHOLOGY AND, CUSPIDS NUMBER (B). THE NUMBER IN EACH TOOTH REPRESENTS CUSPIDS COUNTING.

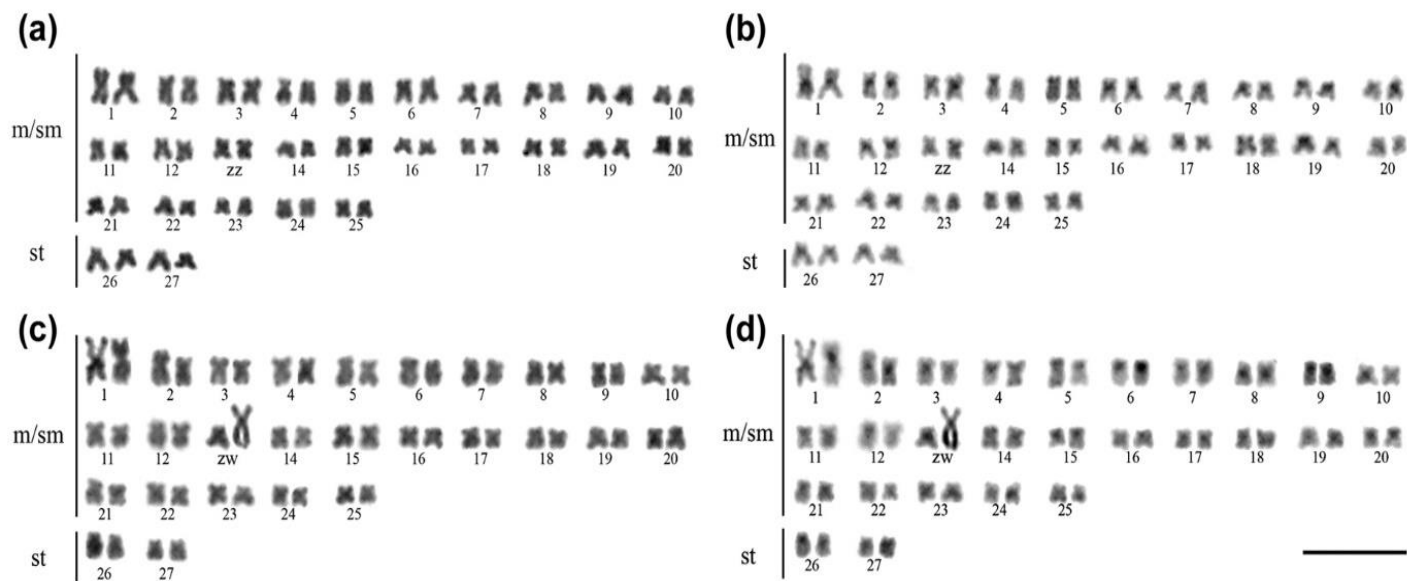


FIGURE 2. KARYOTYPES OF THE MALES (A, B) AND FEMALES (C, D) *APAREIODON* SP. SPECIMENS. GIEMSA STAINING (A, C) AND C-BAND (B, D).

BAR = 10 μM.

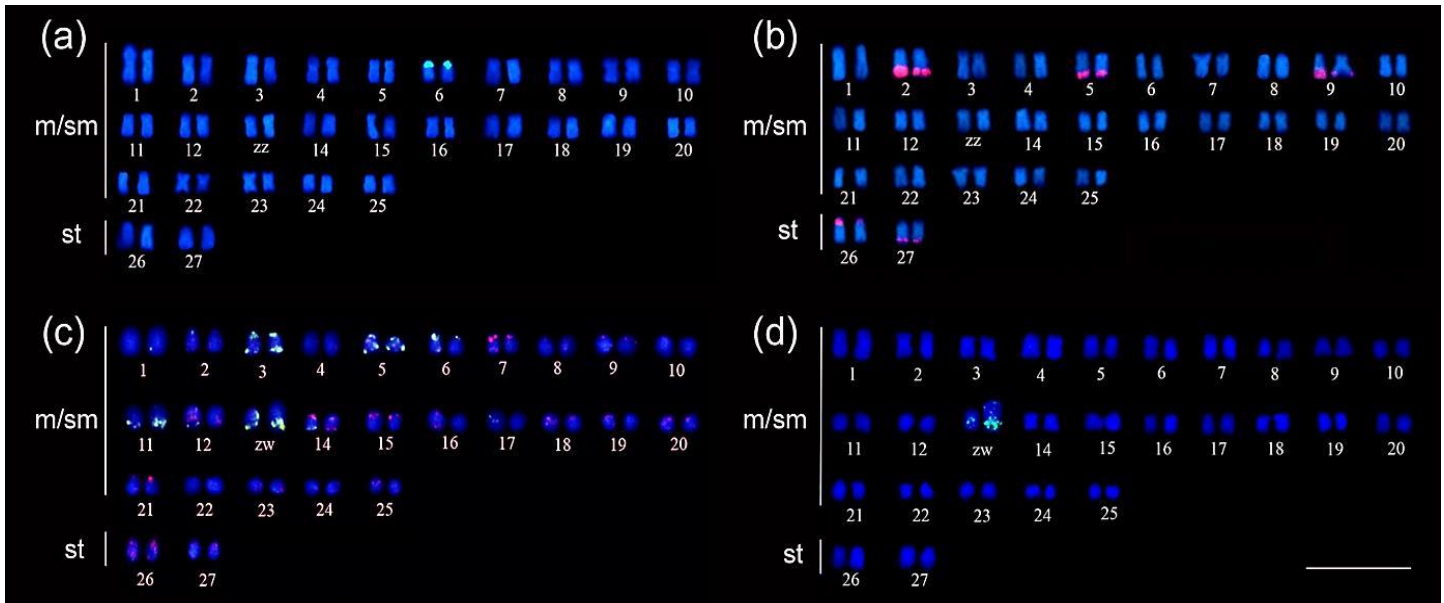


FIGURE 3. KARYOTYPES OF THE *APAREIODON* SP. SUBMITTED TO PROBING FOR *IN SITU* LOCALIZATION: IN (A) 5S RDNA (GREEN); (B) 18S RDNA (RED); (C) PPH 2004 (GREEN) AND (GATA)_n (RED) AND; (D) WAP PROBE (GREEN). BAR = 10 μ M.

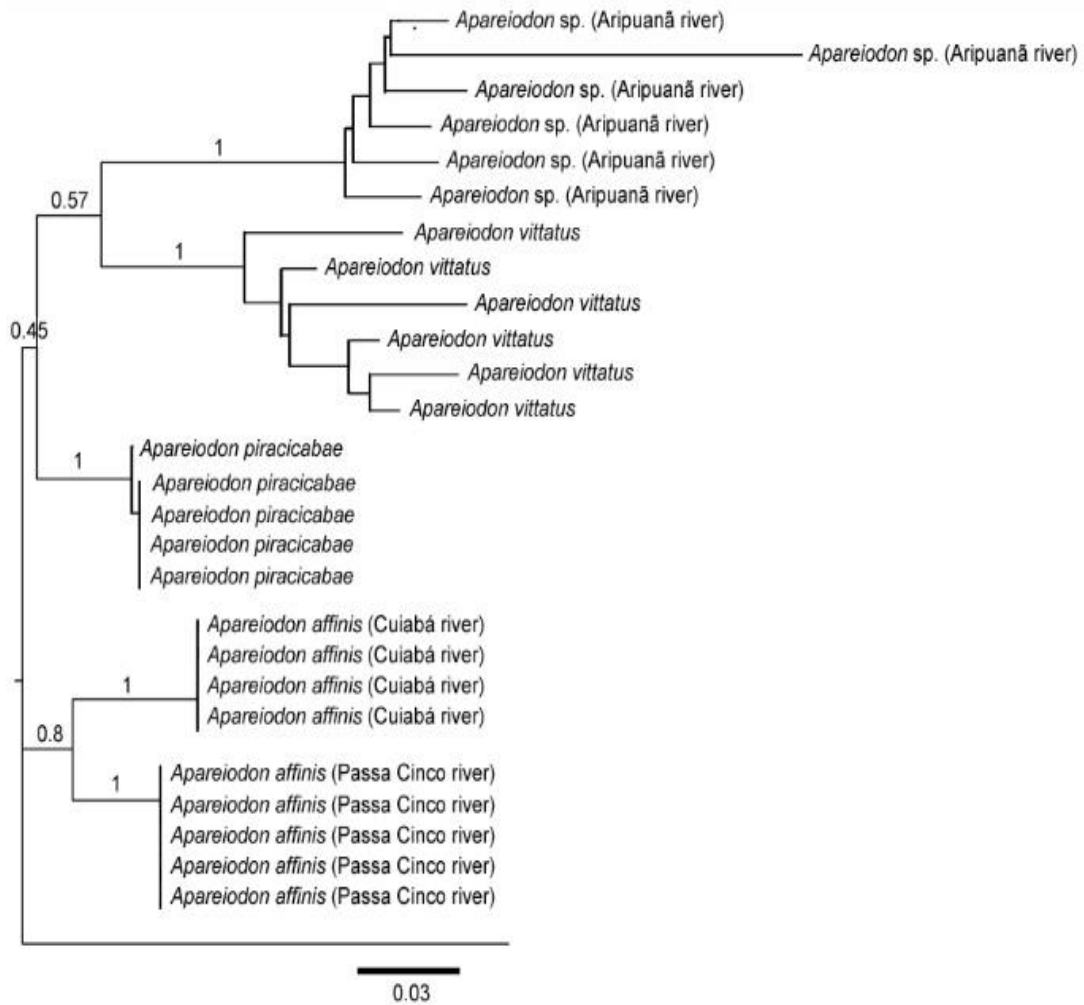


FIGURE 4. K2P DISTANCE NJ DENDROGRAM SHOWING THE FIVE-ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE (THE NUMBERS ON THE BRANCHES ARE BOOTSTRAP VALUES).THE BAR INDICATES THE STIMATED MINIMUM DISTANCE.

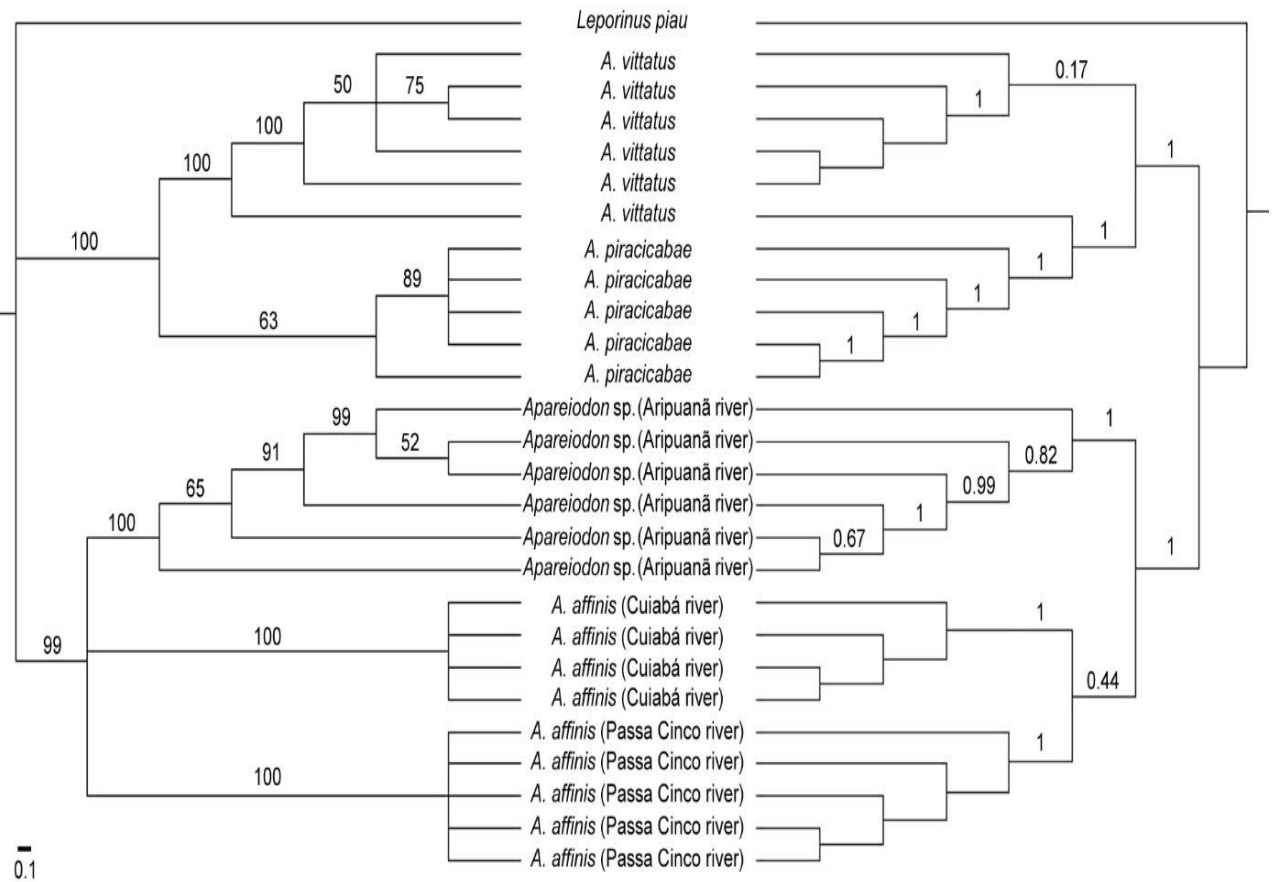


FIGURE 5. SPECIES TREE SHOWING PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS FROM THE FIVE FIVE-ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE. IN LEFT, BAYESIAN TOPOLOGY (THE NUMBERS ON THE BRANCHES ARE POSTERIOR PROBABILITY). IN RIGHT, LIKELIHOOD TREE (THE NUMBERS ON THE BRANCHES ARE BOOTSTRAP VALUES). THE BAR INDICATES THE STIMATED MINIMUM DISTANCE.

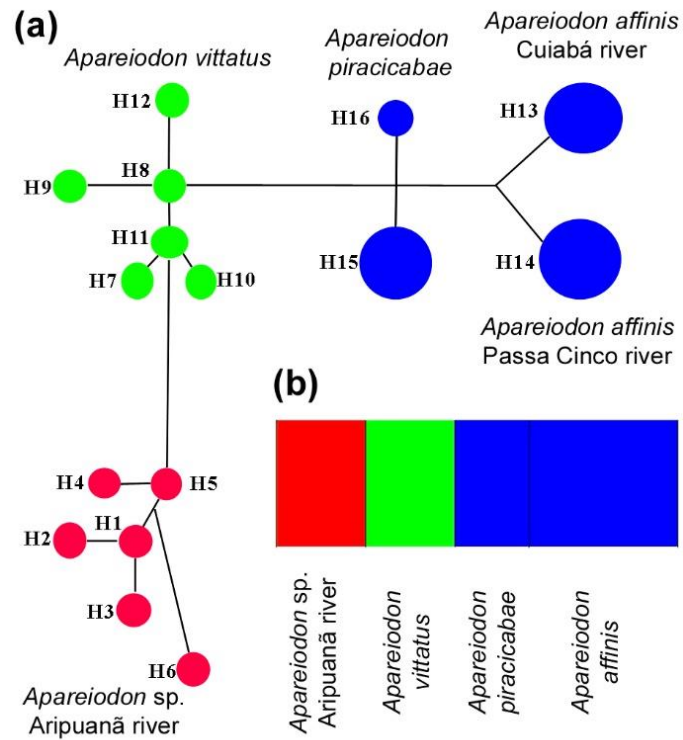


FIGURE 6. MOLECULAR DATA OF *Apareiodon* sp. FROM THE ARIPUANÃ RIVER. IN (A), HAPLOTYPE NETWORK AND RELATIONSHIP AMONG HAPLOTYPES. IN (B) DISTRUCT PLOT FOR THE FIVE-ANALYSED SPECIES/POPULATIONS OF PARODONTIDAE.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, J.S.; REIS, R.E. **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**. University of California Press, California, 2011.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A. **An early stage of sex chromosome differentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (sternopygidae)**. In: XVI Congr s Internt. De G n tica, Toronto, Canad . Resumos p. 258, Toronto, 1988.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; DANIEL, M.F.Z, TOLEDO-FILHO, S.A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**, v. 109, p. 197-200, 2000.
- ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; ENDLER, A.L.; CAVALLARO, Z.I.; JESUS, C.M.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Evolution of B chromosomes in the Prochilodontidae fish, *Prochilodus lineatus*. **Genetica**, v. 127, p. 277-284, 2006.
- BARBOSA, P.; PUCCI, M.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotropical Ichthyology** v. 15, p. e160056, 2017.
- BARRETT, R.D.H.; HEBERT, P.D.N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 481-49, 2005.
- BARROS, A.V.; WOLSKI, M.A.V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 710–716, 2005.
- BELLAFRONTE, E.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): citotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2313–2325, 2009.
- BELLAFRONTE, E.; SCHEMBERGER, M.O.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P. Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 559–570, 2011.
- BELLAFRONTE, E.; SCHEMBERGER, M.O.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. VICARI, M.R. Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann,

1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 770-776, 2012.

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

BERIDZE, T. **Satellite DNA**. Springer Verlag, Berlin, 1986.

BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p. 603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CIOFFI, M. B. **Direct chromosome preparations from freshwater teleost fishes**. In: OZOUF-COSTAZ, C; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (eds) **Fish techniques, Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans**. CRC Press, Boca Raton, pp. 21–26, 2015.

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

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

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Bacia Hidrográfica do rio Aripuanã: Estudo de Inventário Hidrelétrico**. Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Águas. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: Regiões Hidrográficas brasileiras – Edição Especial**. Brasília, 2015.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. **Nucleotide Sequence repetition in DNA**. Carnegie Ins. Year Book, v. 65, p. 78-116, 1966.

BREA, M.; ZUCOL, A.F. **The Paraná-Paraguay Basin: geology and paleoenvironments**. In: Albert, J.S.; Reis, R.E. (eds) Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. University of California Press, Berkeley, pp. 69–87, 2011.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. **Science**, v. 161, p. 529-540, 1968.

BROWN, W.M.; GEORGE JÚNIOR, M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 1967-1971, 1979.

CARVALHO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; POMPEU, P.S.; LEAL, C.G.; OLIVEIRA, C.; HANNER, R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 80–86, 2011

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

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. A ZZ-ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 55, p. 139-150, 2002.

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

CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.

CORANDER, J.; WALDMANN, P.; MARTTINEN, P.; SILLANPÄÄ, M.J. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2363-2369, 2004.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833-2843, 2006.

CUNHA, W. T.; SANTOS, R. C.; ARARIPE, J.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; RÊGO, P. S. Molecular analyses reveal the occurrence of three new sympatric lineages of Velvet worms (Onychophora: Peripatidae) in the eastern Amazon basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 147-152, 2017.

DAGOSTA, F.C.P.; DE PINNA, M. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, p. e170034, 2017.

da ROSA, R.; VICARI, M.R.; DIAS, A.L.; GIULIANO-CAETANO, L. New insights into the biogeographic and karyotypic evolution of *Hoplias malabaricus*. **Zebrafish**, v. 11, p. 3, 2014.

da SILVA, L.L.L.; SANTOS, A.R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1277-1286, 2016.

de LA HERRA´N, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUIZ REJO´N, C.; RUIZ REJO´N, M.; GARRIDO-RAMOS, M.A. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 432–436, 2001.

de OLIVEIRA, M.L.M.; UTSUMONIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.C.; SCACCHETTI, P.C.; PRIMO, C.C.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; CENTOFANTE, L.; MOREIRA-FILHO, O.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Microstructural chromosome reorganization

in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae). **Neotropical Ichthyology**, n. 14, p. 2, 2016.

DEVLIN, R.H.; STONE, G.W.; SMAILUS, D.E. Extensive Direct-Tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y chromosome of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 277–287, 1998.

DEVLIN, R.H.; BIAGI, C.A.; SMAILUS, D.E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. **Genetica**, v. 111, p. 43–58, 2001.

do NASCIMENTO, V.D. **Estudo citogenético e molecular para avaliação da diversidade de espécies em Parodontidae (Actinopterygii, Characiformes)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva). 130p. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2015.

do NASCIMENTO, V.D.; COELHO, K.A.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, R.B.; ZIEMNICZAK, K.; CENTOFANTE, L.; PAVANELLI, C.S.; TORRES, R.A.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? **Zoologischer Anzeiger**, v. 272, p. 93-103, 2018.

DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v. 284, p. 601–603, 1980.

DOVER, G.A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**, v. 2, p. 159-165, 1986.

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

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by Family/ Subfamily**. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Versão Eletrônica acessada em 02/03/2018.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

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

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelations of the Osthariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, p. 297-353, 1981.

FLOYD, R.; EYUALEM, A.; PAPERT, A.; BLAXTER, M. Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 839–850, 2002.

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

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

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

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

GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; VALENTE, G.T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1117-1127, 2010.

GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V. Co-located *hAT* transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, v. 650, p. 49–54, 2018.

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

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

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

HEIKKINEN, E.; LAUNONEN, V.; MULLER, E.; BACHMANN, L. The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 604-614, 1995.

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

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

INGENITO, L.F.S. **Análise Filogenética da Família Parodontidae (Teleostei:Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647-1649, 2012.

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

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

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

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

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

LEIGH, J.W.; BRYANT, D. Application POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 1110-1116, 2015.

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

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

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

LUNDBERG, J.G. **The temporal context for the diversification of neotropical fishes**. In: REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. (eds) **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 13-48, 1998.

MACHADO, T.C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; PUCCI, M.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**, v. 12, p. 65, 2011.

MACHADO, C.D.B; ISHIZUKA, T.K.; FREITAS; P.D.; de VALIATI, V.H.; GALETTI JR., P.M. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, p. 372-382, 2016.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 536-542, 2004.

MENEZES, N.A.; BUCKUP, P.A.; FIGUEIREDO, J.L.; MOURA, R.L. (ed.). Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 160p, 2003.

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. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinni* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

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

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

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

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

MULLER, H. J. Some Genetic Aspects of Sex. **The American Naturalist**, v. 703, p. 118-138, 1932.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321–4325, 1980.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, Inc. 2006.

NOWAK, M.A.; MAY, R.M. **Superinfection and the evolution of parasite virulence**. In: Proc. R. Soc. Lond. B. The Royal Society, 1994. p. 81-89

ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**, v. 284, p. 604–607, 1980.

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, p. 16, 2010.

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

PAVANELLI, C.S. **Family Parodontidae (Parodonts)**. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. JR (eds) **Check list of the freshwaters of South and Central América**, 1st ed. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 46–50, 2003.

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

PEREIRA, L.H.G.; MAIA, G.M.G., HANNER, R., FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul river Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 21, p. 1-9, 2011.

PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, p. 20, 2013.

PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C. **Genômica e o código de barras da vida**. In: Moreira, M. M. **Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações**, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto- SP, 2015.

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

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

PLOHL, M.; BORSTNIK, B.; LUCIJANIC-JUSTIC, V.; UGARKOVIC, D. Evidence for Randon distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. **Genetics Research**, v. 60, p. 7-13, 1992.

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

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

POSADA, D. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 6, unit.6.5, 2003.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

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

RAMIREZ, J.L.; GALETTI JR., P.M. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 93, p. 77-82, 2015.

RAMIREZ, J.L.; BIRINDELLI, J.L.; CARVALHO, D.C.; AFFONSO, P.R.A.M.; VENERE, P.C.; ORTEGA, H.; CARRILLO-AVILA, M.; RODRÍGUEZ-PULIDO, J.A.; GALETTI JR., P.M. Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 149, 2017.

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

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

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

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

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

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

ROSA, S.R.; LIMA, F.C. **Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção**, 2008, 278 p. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumell/Peixes.pdf>> Acesso em: 15/01/2018.

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

SAITO, Y.; EDPALINA, R.R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, p. 157-166, 2007.

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

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

SCHEMBERGER, M.O.; OLIVEIRA, J.I.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; CESTARI, M.M.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Construction and

characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, v. 11, p. 518–527, 2014.

SCHEMBERGER, M.O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; VALENTE, G.T.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M.M.; VICARI, M.R. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, v. 593, p. 308-314, 2016.

SCHLICK-STEINER, B.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 421-438, 2010.

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

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

SMITH, G.P. **Unequal crossover and the evolution of multigene families**. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1974. p. 507-513 .

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

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

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

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

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

TIMBERLAKWE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v. 202, p. 973- 975, 1978.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. Biologia molecular de peixes neotropicais. **Publicatio: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 27–37, 2004.

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.D.E.F.; LUI, R.L.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Genetics**, v. 92, p. 127-130, 2013.

TRALDI, J.B.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisii* (Characiformes, Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal DNAs. **Zebrafish**, v. 1, p. 19-25, 2016.

TRAVASSOS, H. Ictiofauna de Pirassununga. I – Subfamília Parodontinae Eigenmann, 1910 (Actinopterygii - Cypriniformes). **Boletim do Museu Nacional de Zoologia**, v. 129, p. 1-31, 1955.

TRAVENZOLI, N.M.; SILVA, P.C.; SANTOS, U.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, C.; DERGAM, J.A. Cytogenetic and Molecular data demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) species from Southeastern Brazil form a phylogenetic and phylogeographic unit. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. e0137843, 2015.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles - causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5955-5959, 2002.

VARI, R.P. **Higer level phylogenetic concepts within Characiformes (Ostariophysi), a historical review.** *In*: MALABARBA, L. R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C. (eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs, p. 111-122, 1998.

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

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, v. 134, p. 311-317, 2008a.

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

VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R.B.; CESTARI, M.M.; CIOFFI, M.B.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1094–1116, 2010.

VICARI, M.R.; PISTUNE, H.F.M.; CASTRO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M.; ARTONI, R.F. New insights on the

origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, p. 1073–1081, 2011.

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

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

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

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

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

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

ZIEMNICZAK, K.; ARTONI, R.F.; TRALDI, J.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. In situ Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 144, p. 325–332, 2014.

ZIEGLER, C.G.; LAMATSCH, D.K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, p. 23–35, 2003.

ANEXO 1- LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO MMA/ IBAMA/ SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

ANEXO 2- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



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

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 029/2016

Protocolo UEPG – 8782/2016

Título – Prorrogação do projeto de pesquisa "Caracterização de genes relacionados a diferenciação gonadal e elementos transponíveis: modelo em peixes neotropicais. Processo aprovado sob o protocolo UEPG 2855/2014 e carta de aprovação CEUA 13/2014

Interessado: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Data de Entrada –03/06/2016

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 03/06/2016 a 31/08/2017

Considerações

Prezado Professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de aprovada a utilização de 30 peixes.

Ponta Grossa, 03 de junho de 2016.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROPG - CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais
Prof. Dr. Maria Izete Lodi
Coordenadora

ANEXO 3- OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS (BERTOLLO *ET AL.*, 2015).

Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/100g de peso. Manter o peixe em aquário aerado durante 50 minutos, a seguir anestésiar o exemplar colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha. Incubar em estufa a 37°C durante 30 minutos. Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, ressuspender o material repetidas vezes. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, ressuspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm. . Ressuspender novamente o material acrescentando algumas gotas de fixador. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e ressuspender bem o material. Acondicionar em frascos microtubos. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

Pingar 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina. Deixar o material secar ao ar. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

ANEXO 4- SÍNTESE DA SONDA DO RDNA 5S

Para a obtenção da sonda do rDNA 5S foram utilizados 50 ng/ µl de molde, 1 x tampão da reação, 2 mM MgCl₂, 40 µM dATP, dGTP e dCTP, 28 µM dTTP, 12 µM biotina 16-dUTP (Roche Applied Science), 0.3 µM de cada primer (5Sa - 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5Sb - 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3', PENDÁS *et al.*, 1994) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 51 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 5 min.

ANEXO 5- MARCAÇÃO DA Sonda DO RDNA 18S

Para a obtenção da sonda do DNAr 18S foram utilizados 50 ng/ µl de molde, 1 x tampão da reação, 2 mM MgCl₂, 40 µM dATP, dGTP e dCTP, 28 µM dTTP, 12 µM digoxigenina 11-dUTP (Jena), 0.3 µM de cada primer (18Sf 5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3' e 18Sr 5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3') e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 51 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 5 min.

ANEXO 6- REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA (GATA)_n

A reação de amplificação da sonda (GATA)_n foi composta por 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM dTTP, 12 μM digoxigenina 11-dUTP (Jena), 2 mM MgCl₂, 2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 μM primers (GATA)₇ e (TATC)₇. A PCR foi feita em dois ciclos. A primeira amplificação foi realizada com baixa estringência: 4 min a 94°C, 12 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 52°C e 1 min 30 s a 72°C; seguido por 35 ciclos de alta estringência: 1 min a 94°C, 1 min 30 s a 60°C e 1 min 30 s a 72°C. Os produtos da PCR foram confirmados em gel de agarose 1%, onde foram obtidos arrastos entre 1000 – 2000 pb.

ANEXO 7- HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

O procedimento geral da FISH seguiu o descrito por Pinkel *et al.* (1986).

A. Preparação da solução de hibridação

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

B. Preparação das lâminas (lavagens pré-hibridação)

As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram lavadas em tampão fosfato (*phosphate buffer saline*-PBS), por 5 minutos em temperatura ambiente, e desidratadas em uma série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada incubação. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1 %/ PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada incubação. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2x SSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol gelado a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada banho.

C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo "overnight" a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2x SSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução 2x SSC pH 7,0 por 20 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação

em 90 μ l de tampão *non fat dry milk* (NFDM) a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas uma mistura de 100 μ l de tampão NFDM contendo 1:200 de streptavidina alexa flúor 488 (1 μ g/ml) e; 1:500 de antidigoxigenina rodamina a 1 (μ g/ml); permanecendo por 1 h a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - 0,2 μ g/ml) diluído em uma solução "antifade" (Fluka).

ANEXO 8- PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR PELO KIT DA GE HEALTHCARE – *ILLUSTRA* GFX PCR DNA

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