



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES RIBOSSOMAIS E
PEQUENOS DNAs NUCLEARES EM *BRYCONAMERICUS*
(CHARACIDAE)”**

Londrina
2016



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES RIBOSSOMAIS E
PEQUENOS DNAs NUCLEARES EM *BRYCONAMERICUS*
(CHARACIDAE)”**

Londrina
2016

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“ MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES RIBOSSOMAIS E
PEQUENOS DNAs NUCLEARES EM *BRYCONAMERICUS*
(CHARACIDAE)”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito para a
obtenção do título de Doutor (a).

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Dias

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

SANTOS, ANGÉLICA ROSSOTTI DOS.

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES RIBOSSOMAIS E PEQUENOS DNAs NUCLEARES EM BRYCONAMERICUS (CHARACIDAE) / ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS. - Londrina, 2016.
97 f. : il.

Orientador: ANA LÚCIA DIAS.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. PEIXES - Teses. 2. CITOGENÉTICA - Teses. 3. DNAr - Teses. 4. DNAsn - Teses. I. DIAS, ANA LÚCIA. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

ANGÉLICA ROSSOTTI DOS SANTOS

**“MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES RIBOSSOMAIS E PEQUENOS
DNAS NUCLEARES EM *BRYCONAMERICUS* (CHARACIDAE)”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção
do título de Doutor (a).

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. **Ana Lúcia Dias**
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dra. **Ana Luiza de Brito Portela-Castro**
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. **Roberto Laridondo Lui**
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Prof^a Dra. **Ana Cláudia Swarça**
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dra. **Fernanda Simões de Almeida**
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. **Roberto Ferreira Artoni** - suplente
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

Prof^a Dra. **Renata da Rosa** – suplente
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho à minha família, minha base: meus pais, irmãos e meu esposo Leonardo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof^a Dr^a Ana Lúcia Dias pela orientação e pelo apoio em todos os momentos, durante esses quatro anos e em especial àqueles momentos em que eu desacreditava, em que tudo parecia dar errado e ela se mostrava sempre otimista e perseverante. Muito obrigada pela confiança em mim depositada durante esses anos.

Agradeço também à professora Dr^a Lucia Giuliano-Caetano pelo apoio durante todo o tempo que estive no laboratório e em especial pelas coletas realizadas, sem as quais esse trabalho não teria se concretizado. E à prof^a Dr^a Renata da Rosa, por todas as dúvidas esclarecidas desde que entrei no laboratório e também pelo apoio e contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao prof. Dr. José Luiz Birindelli, pelas inúmeras ajudas na identificação dos exemplares. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora professores doutores: Ana Luiza, Roberto Laridondo Lui, Ana Cláudia e Fernanda, por aceitarem contribuir com sugestões neste trabalho.

À Sueli, nossa eterna secretária, por toda ajuda, amizade e competência. Aos técnicos de laboratório Dário e Melissa, por toda a ajuda fornecida.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal: Ana Beatriz, Mariana, Angélica Tiepo, Fábio, Juceli, Mateus, Poliana, Raquel Bozini e Raquel Milanezi, Jaqueline e Larissa, pelos momentos de convivência e descontração e por toda ajuda prestada.

Aos colegas que fiz no laboratório e que hoje seguem sua vida... amizades que levarei eternamente: Tati, Laura, Larissa Pires, Natália, Marce e Renata. Pessoas responsáveis por muita coisa que hoje sei da citogenética, que me receberam de braços abertos desde o estágio. Faltam palavras para agradecer tudo que fizeram por mim. Muito obrigada!

À Juceli, minha colega de laboratório e de turma que me socorreu inúmeras vezes. Ju muito obrigada!

Em especial agradeço à amiga Mari, pelos nossos momentos de trabalho juntas e conhecimentos recíprocos. Momentos nem sempre fáceis, mas que conseguimos “sobreviver” graças ao nosso jeito de levar a vida numa boa. Bem como por nossos momentos de descontração e risadas, muitas aliás. Amizade que ultrapassou os limites do laboratório enraizando para a nossa vida pessoal, a academia... todo tempo, onde tem uma, quase certeza que a outra esta junta. Nesses dois últimos anos uma amizade verdadeira e sincera nasceu, espero por toda vida.

Agradeço também ao Cristian, que aceitou nos ajudar e nos recebeu de prontidão em Botucatu, dedicando muito de seu precioso tempo a nos ensinar. E também pelas mensagens de socorro respondidas. Muito obrigada, você contribui pra que uma parte muito importante desse trabalho fosse concretizada.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por abrir as portas de seu laboratório na UNESP, que foi de extrema importância nesta pesquisa.

Às professoras doutoras Fernanda e Silvia Sofia pelo empréstimo do laboratório entre outras coisas. Muito obrigada!

Não posso deixar de agradecer também ao Wilson, pelas inúmeras vezes que precisei de sua ajuda nunca se negou. E também à Same, Caroline e Camila, sempre dispostas a me ajudar, e também pelos momentos de descontração e risadas que tive durante o tempo que permaneci no laboratório. Sou muito grata à todos vocês!

Ao professor Laurival que permitiu não apenas o uso do laboratório bem como disponibilizou muito material para que parte desse trabalho fosse desenvolvido. Muito obrigada pela sua paciência e dedicação e por todas as dúvidas esclarecidas. Às alunas Priscila, Karla e Patrícia que sempre me ajudaram quando necessário, dividiram o seu tempo comigo no laboratório durante o tempo que aí estive, e que não foi pouco! Sem contar também nos momentos de alegria e descontração

Em especial agradeço à minha família, meu pais Sérgio e Cida, por serem meu pilar, e por todo amor ensinamentos passado à mim e aos meus irmãos. Pacífico e Deivid, agradeço por todo nosso amor e união. Às minhas cunhadas, Elis e Areta que também aprendi a amar,

em especial à Elis e ao Pacífico que me permitiram experimentar o amor mais puro e lindo dessa vida – o de ser tia do Miguel e do Bento, muito obrigada! Ao meu parceiro, amigo, companheiro e esposo Leonardo pelos momentos que tivemos que ficar longe um do outro, pelos momentos difíceis de me aturar, enfim por todos os momentos. Agradeço por sua compreensão e cumplicidade em todas as horas. Te amo! Te Agradeço também pela família que me deu de presente, que me acolheu e completa a nossa família.

Enfim, muitas pessoas tenho à agradecer durante o desenvolvimento desse trabalho, à todos que contribuíram de forma direta e indireta sou muito grata, sem vocês nada teria dado certo, de tudo que aconteceu nesses quatro anos de uma coisa tenho certeza, muitas pessoas de bom coração encontrei, e com certeza isso fez toda a diferença!

Não posso deixar de agradecer à Deus, que me deu forças pra seguir em muitos momentos, que não me deixou esmorecer...

Muito obrigada!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

SANTOS, Angélica Rossotti dos. **Identificação de Marcadores Cromossômicos na Análise da Variabilidade Cariotípica no Gênero *Bryconamericus*: mapeamento físico de genes ribossomais e pequenos DNAs nucleares.** 2016. 97 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

RESUMO

Characidae compreende cerca de 1100 espécies válidas de peixes extremamente diversificados e distribuídos por toda região neotropical. O gênero *Bryconamericus* é conhecido por não apresentar relações filogenéticas bem definidas e, atualmente, esse gênero está inserido na subfamília *Stevardiinae*. Sondas de DNAs repetitivos vem sendo cada vez mais aplicadas no estudo de peixes com a finalidade de auxiliar na compreensão de problemas taxonômicos, bem como na diferenciação de populações. Apesar de poucas espécies de *Bryconamericus* terem sido analisadas citogeneticamente, o número diploide parece estar bem estabelecido nesse grupo de peixes, entretanto a presença de variações na macro e micro-estrutura cariotípica tem sido comum em várias populações. A maioria dos estudos relacionados ao mapeamento de sítios de DNAs repetitivos no gênero, se restringe ao mapeamento de DNAr 18S e, até o momento, apenas três espécies apresentam resultados para o DNAr 5S. É característico a presença de AgRONS múltiplas nesse gênero, sendo estas regiões confirmadas com o mapeamento dos sítios de DNAr 18S todavia, já foram relatadas espécies com presença de cístrons ribossômicos 18S em apenas 1 par cromossômico. Dessa forma, no presente trabalho, foi realizada a caracterização citogenética e mapeamento de sítios de DNAs repetitivos em *Bryconamericus ecai* do rio Forquetinha-RS, *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho, *Bryconamericus* sp. rio Cambuta e *Bryconamericus* aff. *iheringii* do ribeirão Três Bocas, visando melhor entendimento da estrutura e evolução cariotípica desse grupo de peixes. Em todas as populações foi observado o número diploide igual a 52, com variação nas suas fórmulas cariotípicas. *Bryconamericus ecai* apresentou três novos citótipos: citótipo V com fórmula cariotípica (FC) =8m+16sm+14st+14a e número fundamental (NF) igual a 90; citótipo VI com FC=10m+16sm+8st+18a e NF= 86 e citótipo VII com FC=8m+18sm+10st+16a e NF=88, sendo então caracterizados sete citótipos nesse população. Nestes três citótipos foram observadas AgRONS múltiplas, confirmadas pela hibridação fluorescente *in situ*, com sonda de DNAr 18S, assim como sítios múltiplos de DNAr 5S no entanto, apenas um par de cromossomos portador do de DNAsn U2 (pequenos DNA nucleares) foi observado. Os exemplares de *Bryconamericus* sp., ribeirão Vermelho, não apresentaram variação intrapopulacional mantendo a FC=16m+14sm+10st+12a e NF igual a 92 para todos os indivíduos. No entanto, diferenças entre os indivíduos foram observadas quando aplicadas as técnicas de impregnação de nitrato de prata e a hibridação *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S e de DNAsn U2, separando essa população em dois grupos. *Bryconamericus* sp. rio Cambuta apresentou FC=2m+12sm+20st+20a e NF=88, com sítios múltiplos de DNAr 18S e apenas um par portador dos cístrons de DNAr 5S e DNAsn U2. Estes são os primeiros dados utilizando esta sonda de DNAsn U2 em Characidae. Com a utilização da ferramenta de identificação molecular CO1, pela construção da árvore filogenética, foi possível observar diferença genética significativa entre essas populações de *Bryconamericus*, formando dois diferentes grupos: um formado pelas duas populações de *Bryconamericus* sp., subdivididos em espécimes ribeirão Vermelho e rio Cambuta e um segundo grupo, mais distante, formado pelos indivíduos de *B. ecai*. No entanto, não foi possível separar os dois grupos do ribeirão Vermelho, onde foi observada variação intrapopulacional nas análises citogenéticas. Em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do ribeirão

Três Bocas foi realizado o mapeamento dos sítios de DNAr 5S, dando continuidade aos dados anteriormente obtidos para essa população apresentou cinco citótipos: citótipo II FC= 18m+14sm+10st+10a e NF = 94; citótipo III FC=20m+18sm+4st+10a e NF = 94; citótipo IV com 20m+14sm+12st+6a e NF = 98; citótipo V com 22m+18sm+8st+4a e NF = 100 e citótipo VI com FC= 18m+24sm+6st+4a e NF = 100. Foram observados sítios múltiplos de DNA ribossômico 5S para os cinco citótipos analisados, sendo que em todos foram observadas marcações terminais, além de um par com marcação intersticial nos citótipos II, IV e V. Todos os resultados confirmaram a grande diversidade cariotípica estrutural em *Bryconamericus* evidenciando ainda um polimorfismo de sítios de DNAs ribossômicos. Dessa forma pode-se inferir que, está ocorrendo um processo evolutivo divergente ou mesmo que essa variabilidade seja devido à natureza polimórfica desse grupo de peixes.

Palavras-chave: Diversidade cariotípica. Pisces. Polimorfismo. DNAs repetitivos. Citocromo *c* oxidase 1.

SANTOS, Angélica Rossotti dos. **Chromosome markers identification in the analysis of karyotypic variability in *Bryconamericus* Genus: physical mapping of ribosomal genes and small nuclear DNA.** 2016. 97 p. Thesis (Doctor's Degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

ABSTRACT

Characidae comprise about 1100 valid species of fishes extremely diverse and distributed throughout the Neotropics. The *Bryconamericus* genus is known to not have well-defined phylogenetic relationships and currently this genus is inserted in Stevardiinae subfamily. Repetitive DNA probes has been increasingly applied in the study of fishes in order to assist in understanding of taxonomic problems, as well as the differentiation of populations. Despite few species of *Bryconamericus* have been analyzed cytogenetically, the diploid number seems to be well established in this group of fishes, however the presence of variations in the macro and microstructure karyotypic has been common in many populations. Most studies related to mapping of repetitive DNA sites in the genus, is restricted to the mapping of 18S rDNA sites and, until now, only three species have results for 5S rDNA. It is characteristic of the presence of multiple sites AgRONS in this genus, these regions being confirmed with the mapping of 18S rDNA sites however, have been reported species with the presence of 18S ribosomal cistrons in only one chromosome pair. Thus, in the present study was performed cytogenetic characterization and mapping of repetitive DNAs sites in *Bryconamericus ecai*, from Forquetinha river (RS), *Bryconamericus* sp. Vermelho stream, *Bryconamericus* sp. Cambuta river and *Bryconamericus* aff. *iheringii* from Três Bocas stream, in order to better understanding the structure and karyotypic evolution of this group of fishes. In all populations was observed diploid number equal to 52, with variation in their karyotypic formulae. *Bryconamericus ecai* presented three new cytotypes: cytotype V with karyotypic formulae (KF) = 8m + 16sm + 14st + 14a and fundamental number (FN) equal 90; cytotype VI with KF = 10m + 16sm + 8st + 18a and FN= 86 and cytotype VII with KF = 8m + 18sm + 10st + 16a and FN = 88, seven cytotypes then being characterized in that population. In these three cytotypes were observed multiple AgRONS, as confirmed by fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA probe as well as multiple sites 5S rDNA however, only one pair of chromosomes carrier U2 snDNA (small nuclear DNA) was observed. Exemplary of *Bryconamericus* sp. from Vermelho stream showed no intrapopulation variation, while maintaining KF = 16m + 14sm + 10st + 12a and FN equal to 92 for all individuals. However, differences between individuals were observed when the applied silver nitrate impregnation techniques and *in situ* hybridization with probes 18S and 5S rDNA and U2 snDNA, separating this population into two groups. *Bryconamericus* sp., from Cambuta river presented KF = 2m + 12sm + 20st + 20a and FN = 88, with multiples sites of 18S rDNA and only a couple of carrier cistrons 5S rDNA and U2 snDNA. These are the first data using U2 snDNA probe in Characidae. With the use of molecular identification tool CO1, the construction of the phylogenetic tree, we observed significant genetic differences between these populations of the genus *Bryconamericus*, forming two different groups: one formed by the two populations of *Bryconamericus* sp., divided into Vermelho stream specimens and Cambuta river and a second group, more distant, consisting of individuals of *B. ecai*. However, it was not possible to separate the two groups os Vermelho stream, where it was observed intrapopulation variation in cytogenetic analysis. In *Bryconamericus* aff. *iheringii* from Tres Bocas stream was realized mapping of 5S rDNA sites, continuing to data previously obtained for this population that has five cytotypes: cytotype II KF = 18m + 14sm

+ 10st + 10a and FN = 94; cytotype III KF = 20m + 18sm + 4st + 10a and FN = 94; cytotype IV with 20m + 14sm + 12st + 6a and FN = 98; cytotype V with 22m + 18sm + 8st + 4a and FN = 100 and cytotype VI with KF = 18m + 24sm + 6st + 4a and FN = 100. Were observed multiple sites of 5S ribosomal DNA for the five cytotypes analyzed, which is in all terminal markings were observed, as well as one pair with interstitial marking in cytotypes II, IV and V. All results confirmed the great structural karyotypic diversity in *Bryconamericus* showing a polymorphism of ribosomal DNA sites, thus we can infer that is occurring divergent evolutionary process or that this variability is due to the polymorphic nature of this group of fishes.

Key-words: karyotypic diversity. Pisces. Polymorphism. repetitive DNAs. Cytochrome *c* oxidase 1.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Locais de coleta e espécies estudadas. a) mapa indicando os locais de coleta; b) *Bryconamericus ecai*; c) *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho; d) *Bryconamericus* sp. rio Cambuta; e) *Bryconamericus* aff. *iheringii*. 35

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1** - Cariótipo de *Bryconamericus*. a) *Bryconamericus ecai* – citótipo V; b) *B. ecai* – citótipo VI; c) *B. ecai* – citótipo VII; d) cariótipo de *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho; e) cariótipo de *Bryconamericus* sp. rio Cambuta. Barra = 5µm. 61
- Figura 1.2** - Cariótipos com sítios de DNAr 18S. a) *B. ecai* - citótipo V; b) *B. ecai* - citótipo VI; c) *B. ecai* - citótipo VII; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho grupo 1: o par 24 mostrando heteromorfismo de tamanho; grupo 2: em destaque o par 8 com marcação intersticial; e) Double FISH em *Bryconamericus* sp., rio Cambuta, utilizando sonda de DNAr 18S (vermelho) e de DNAsn U2 (verde). Os boxes mostram diferentes padrões de AgRONS. Em d os boxes com a constrição secundária nos dois grupos. Barra = 5µm. 62
- Figura 1.3** - Cariótipos mostrando as diferentes marcações de DNAr 5S: a) *B. ecai* - citótipo V; b) *B. ecai* - citótipo VI; c) *B. ecai* - citótipo VII; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho, grupo 1; e) *Bryconamericus* sp., ribeirão Vermelho, grupo 2; f) *Bryconamericus* sp., rio Cambuta. Nos boxes os pares portadores dos sítios de DNAsn U2. 63
- Figura 1.4** - Ideograma representativo das espécies analisadas mostrando os diferentes bandamentos: a) citótipo V; b) citótipo VI; c) citótipo VII de *Bryconamericus ecai*; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho, grupo 1; e) *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho, grupo 2; f) *Bryconamericus* sp. rio Cambuta. m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; st= subtelocêntrico; a= acrocêntrico. 64
- Figura 1.5** - Representação gráfica da distância genética K2P, entre as seqüências CO1 de 16 amostras de *Bryconamericus*. Foi utilizado o método de Neighbor-Joining para o agrupamento da distância genética com

1.000 bootstraps em software MEGA v6.0. Valores de bootstrap dispostos próximos aos nós. Círculos: *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho; triângulos: *Bryconamericus* sp., do rio Cambuta; quadrados: *Bryconamericus ecai*, do rio Forquetinha..... 65

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Hibridação fluorescente *in situ*, mapeamento cromossômico de DNAr 5S em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do ribeirão Três Bocas. A) citótipo II; B) citótipo III; C) citótipo IV; D) citótipo V; E) citótipo VI. Barra = 5µm. 83

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

- Tabela 1** - Dados citogenéticos em espécies de *Bryconamericus*. 2n = Número diploide, FN = Número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérico, c= centromérico, i.= intersticial, p = braço curto, q = braço longo, BC= Banda C, RF= Referência..... 36
- Tabela 2** - Locais de coleta e espécies analisadas de *Bryconamericus*..... 38

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.1** - Dados citogenéticos em espécies de *Bryconamericus*. 2n = número diploide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérico, i.= intersticial, p = braço curto, q = braço longo, RF= Referências..... 59

CAPÍTULO 2

- Tabela 2.1** - Dados da localização de DNAr 5S na família Characidae 80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Características gerais de Characidae com ênfase no gênero <i>Bryconamericus</i>	20
1.2	Considerações citogenéticas sobre o gênero <i>Bryconamericus</i>	21
1.3	Mapeamento de DNAs repetitivos em peixes	24
1.4	Localização de sítios de DNAs ribossômicos 18S e 5S em <i>Bryconamericus</i>	27
1.5	Análise integrativa de sequência de DNA mitocondrial e citogenética	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS	32
3.1	Locais de coleta	32
3.2	Espécies estudadas	33
CAPÍTULO 1- Organização cariotípica, e mapeamento de três classes de DNAs repetitivos do gênero <i>Bryconamericus</i> (Characidae): utilização de DNA barcoding na diferenciação entre populações		
		39
RESUMO		40
INTRODUÇÃO		41
MATERIAL E MÉTODOS		43
RESULTADOS		47
DISCUSSÃO		50
REFERÊNCIAS		54
CAPÍTULO 2- Mapeamento cromossômico de DNA ribossomal 5S em diferentes citótipos de <i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> (Characidae): uma análise da distribuição de genes ribossomais na família Characidae		
		66
RESUMO		67
INTRODUÇÃO		68
MATERIAL E MÉTODOS		70

RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de Characidae com ênfase no gênero *Bryconamericus*

Characidae pertence à ordem Characiformes e é conhecida como a família mais heterogênea dentro dos peixes neotropicais, por apresentarem grande variação de tamanho, hábitos alimentares, estratégias reprodutivas, padrões comportamentais, preferências de habitats, padrões de colorido e variações osteológicas, anatômicas e morfológicas (GRAÇA E PAVANELLI, 2007). É característico dos caracídeos a presença de escamas que recobrem o corpo, nadadeiras pélvicas geralmente situadas bem atrás da inserção das nadadeiras peitorais, raios das nadadeiras moles e, em muitos casos, presença de uma nadadeira adiposa (BRITSKI et al., 1999).

Espécies de caracídeos ocorrem desde o sudoeste do Texas, nos Estados Unidos, até as regiões de clima ameno da Argentina e do Chile no continente americano. Nos riachos do sudoeste brasileiro são freqüentes as espécies de *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Cheirodon*, *Bryconamericus*, *Deuterodon* e *Hollandichthys* (BUCKUP, 2007). Muitas espécies têm importância na pesca comercial e esportiva e outras são amplamente utilizadas por aquarofilistas (GRAÇA E PAVANELLI, 2007).

De acordo com Eschmeyer (2016), a família Characidae apresenta 1107 espécies válidas. Trata-se de um grupo altamente heterogeneidade, devido a isso diversos gêneros são organizados em subfamílias. No entanto, nem todos os gêneros pertencentes à família apresentam evidência de monofiletismo, deixando uma grande parcela de caracídeos listados como *Incertae sedis*.

De acordo com Lima et al. (2003), *Incertae sedis* constitui um grupo altamente heterogêneo de peixes de pequeno a grande porte com 620 espécies distribuídas em 88

gêneros, incluindo *Hyphessobrycon* Durbin, em Eigenmann, 1908 (97 espécies), *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (86 espécies), *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (58 espécies), *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (56 espécies), *Hemigrammus* Gill, 1858 (43 espécies), entre outros. Muitos destes gêneros anteriormente haviam sido incluídos na subfamília Tetragonopterinae entretanto, por falta de evidências de que esse grupo constitua um grupo monofilético, essa classificação não pode ser adotada.

Em estudos morfológicos realizado por Mirande (2010), e genéticos realizados por Oliveira et al. (2011) em espécies da família Characidae, diversos gêneros, antes pertencentes à subfamília Tetragonopterinae e também ao grupo *Incertae sedis*, foram realocados em outras famílias, como o gênero *Bryconamericus* que, atualmente, faz parte de um grupo polifilético e pertence à subfamília *Stevardiinae*.

O gênero *Bryconamericus* é constituído por 93 espécies descritas (Eschmeyer, 2016). As espécies deste gênero são muito semelhantes entre si, diferindo apenas em pequenos detalhes, sendo que os padrões de coloração são invariáveis; e estão distribuídas por diferentes regiões das Américas Central e do Sul (GÉRY, 1977).

Segundo Silva (2004), *Bryconamericus* é um gênero polifilético com muitos grupos de espécies. Este autor reconheceu 3 grupos de espécies na América do Sul, baseados principalmente na posição e forma dos dentes maxilares: os grupos *exodon*, *microcephalus* e *iheringii*. O último inclui todas as espécies encontradas na região sul da América do Sul.

1.2 Considerações citogenéticas sobre o gênero *Bryconamericus*

Poucos estudos citogenéticos foram realizados em espécies do gênero *Bryconamericus* entretanto, o número diplóide igual 52 parece ser característico para este grupo pois, até o momento, apenas *Bryconamericus* sp E, apresentou $2n=54$ (WASKO E

GALETTI JR. 1998). Apesar de constante o número diploide, são significativas as variações na macro e microestrutura cariotípica em *Bryconamericus* e, conseqüentemente, comum a ocorrência de citótipos tanto inter quanto intrapopulacional (Tabela 1).

Eberhardt et al. (2012), estudando *Bryconamericus aff. iheringii* do ribeirão Três Bocas encontrou quatro citótipos diferentes e Silva et al. (2014) encontrou mais seis citótipos para essa população, totalizando dez citótipos nessa população. Estes dados confirmam a grande variabilidade cariotípica intrapopulacional existente na espécie. Segundo Eberhardt et al (2012) alguns citótipos podem ter sido originados a partir de rearranjos cromossômicos, como inversões pericêntricas. Silva et al. (2014) sugere que o citótipo I observado nesta população, por apresentar maior diferença em relação ao número fundamental e também por ser o único a apresentar sistema de RONS simples, pode ser considerada uma espécie diferente vivendo em simpatria no ribeirão Três Bocas. Os demais citótipos podem ter sido gerados por cruzamentos entre eles e também por inversões pericêntricas.

Variações cromossômicas intrapopulacionais também foram reportadas para a espécie *Bryconamericus ecai*, do rio Forquetinha, Laguna dos Patos/RS, onde Santos et al. (2012) encontraram quatro diferentes citótipos nesta população. Entretanto, Piscor et al. (2013) observaram apenas variações interpopulacionais nas três espécies analisadas de *Bryconamericus* (Tabela 1).

De acordo com Silva et al. (2014), os resultados relatados na literatura mostram que, provavelmente, rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos, como inversões pericêntricas, que alteram a fórmula cariotípica mas, no entanto, não modificam o número diplóide, podem ser os mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica do gênero *Bryconamericus*.

As regiões organizadoras de nucléolos (RONS) também são bastante variáveis neste grupo de peixes, podendo apresentar variações intra e interindividuais no número e

localização, caracterizando *Bryconamericus* como um grupo com RONS múltiplas. Entretanto, um sistema simples de RONS já foi observado em algumas espécies de *Bryconamericus* (tabela 1). De acordo com Silva et al (2014) a variabilidade na localização das RONS pode ser resultado da dispersão destes genes que provavelmente ocorreu devido a rearranjos cromossômicos, como transposição e / ou translocação.

Variabilidade quanto à localização da heterocromatina nas espécies do gênero *Bryconamericus*, também foi observada entre as espécies e populações estudadas, sendo os blocos heterocromáticos observados em todas as regiões cromossômicas, ou seja nas regiões pericentroméricas, teloméricas, intersticiais ou centroméricas (Tabela 1). Santos et al. (2012) utilizaram a técnica de bandamento C com coloração sequencial com os fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI e com base nos resultados foi possível diferenciar quatro citótipos de *Bryconamericus ecai*.

A localização dos blocos de heterocromatina foi relevante na análise de três espécies do gênero analisadas por Piscor et al. (2013). Segundo estes autores a similaridade na posição da heterocromatina demonstra que este padrão pode ser conservado e que há similaridade entre o DNA repetitivo presente no genoma destas três espécies.

Silva et al. (2014) observaram a presença de discreta heterocromatina na região pericentromérica dos cromossomos e, após a coloração sequencial com os fluorocromos base-específicos cromomicina A3 (CMA₃) e 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), confirmaram marcações positivas para o DAPI na região intersticial dos cromossomos e marcações CMA₃⁺ na região terminal dos cromossomos, sendo estes últimos blocos coincidentes com as AgRONS.

A correspondência entre os sítios AgRONS e os sinais positivos para o fluorocromo CMA₃ ou mitramicina (MM) já foi observada em diferentes espécies de *Bryconamericus* como relatado por Wasko e Galetti Jr. (1999); Portela-Castro (1999); Paintner-Marques et

al.(2002, 2003); Santos et al. (2012), demonstrando, dessa forma, que é comum a associação entre as regiões organizadoras de nucléolo e sequências ricas em pares de bases GC.

1.3 Mapeamento de DNAs repetitivos em peixes

Atualmente, o mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos tem se mostrado de grande importância para a citogenética de peixes, podendo auxiliar na compreensão de problemas taxonômicos (e.g., BLANCO et al., 2011), na filogenia (e.g., TEIXEIRA et al., 2009), na diferenciação de populações (e.g., MARTINEZ et al., 2011), bem como na compreensão da evolução dos cromossomos B (e.g., SILVA et al., 2014) e cromossomos sexuais (e.g., VICARI et al., 2008).

Por muitos anos o DNA repetitivo foi considerado como “DNA lixo” (DOOLITTLE e SAPIENZA, 1980). De acordo com Kidwell (2002), sabe-se atualmente que este tipo de DNA pode estar envolvido em rearranjos cromossômicos, tais como: deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsável por significativas variações cariotípicas observadas em muitos grupos.

O genoma dos eucariotos é composto por segmentos de DNA de diferentes tamanhos que se repetem de dezenas a milhões de vezes, chamados de DNAs repetitivos (TAFT et al., 2007). Este DNA pode ser dividido em moderadamente repetitivo, quando apresenta de 10 a 10^5 cópias por genoma e sequências altamente repetitivas com mais de 10^5 por genoma.

DNA altamente repetitivo pode ser dividido em dois grupos principais: repetições em *tandem*, representadas pelos DNA satélites, microssatélites e minisatélites, e repetições interespaçadas dispersas, representadas pelos elementos transponíveis (ET) (TIMBERLAKE, 1978; CHARLESWORTH et al., 1994; JURKA et al., 2005).

DNA moderadamente repetitivo compreendem um grupo de genes descendentes de um ancestral comum, que tem seqüências similares e estão relacionados funcionalmente (NEI e ROONEY, 2005). Fazem parte desse tipo de DNA as chamadas famílias multigênicas, que são seqüências repetidas de DNA, que codificam importantes moléculas tais como: os RNAs ribossomais (RNAr) (MARTINS, 2002) e pequenos DNAs nucleares (DNAsn) (VALADKHAN, 2005).

RNA ribossômico é um dos mais abundantes RNAs na célula eucariótica, e podem ser divididos em duas famílias multigênicas, repetidas em tandem: a primeira representada pelo DNAr 45S, que compreende as regiões que transcrevem os genes RNAs 28S, 18S e 5,8S, além de espaçadores intergênicos; e a segunda, DNAr 5S, consiste de uma seqüência altamente conservada de 120 pares de bases e espaçadores não transcritos (NTS) de tamanho variável (MARTINS, 2007). Os genes do DNAr 45S são transcritos pela polimerase I e o gene de DNAr 5S pela polimerase III.

A unidade de repetição do DNAr 45S se encontra em locais específicos do cromossomo, formando muitas vezes uma constrição secundária devido a organização da cromatina, denominada região organizadora de nucléolo (RON) (LONG e DAVID, 1980). Tradicionalmente, a RON é detectada pela impregnação com nitrato de prata, técnica essa que permite apenas a observação das RONS que permaneceram ativas na intérfase anterior, pois o nitrato de prata se associa as proteínas envolvidas na produção do ribossomo e não no DNAr (MILLER et al., 1976). A hibridização fluorescente in situ (FISH) com sonda de DNAr da família 45S, principalmente o DNAr 18S, permite a localização precisa da RON, independente de sua atividade transcricional (OLIVEIRA, 1999). A família multigênica do DNAr 5S não está associada a formação do nucléolo contudo, em alguns casos, pode ser encontrada intercalada com outras famílias multigênicas, entre elas genes de histonas e até mesmo o DNAr 45S (DROUIN e MONIZ DE SÁ, 1995).

O mapeamento cromossômico, por hibridação fluorescente *in situ* (FISH), dos DNAs ribossomais 18S e 5S, vem sendo realizado com grande frequência em estudos citogenéticos de peixes, mostrando ser um importante marcador cromossômico, uma vez que sua localização pode diferir entre espécies, assim como entre populações da mesma espécie, podendo estar em um único par cromossômico, vários pares, em sintenia entre eles e com outros DNAs repetitivos (TRALDI et al., 2013; PANSONATO-ALVES et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Pequenos DNAs nucleares (DNAsn), podem também pertencer a uma família multigênica que transcrevem RNA não codificante, que compõem o spliceossomo, grandes complexos de ribonucleoproteínas que realiza o *splicing*, sendo a maior e mais complicada maquinaria celular conhecida (VALADKHAN, 2005). A remoção dos íntrons do pré-RNA_m, chamada de *splicing*, é uma etapa fundamental na expressão dos genes dos eucariotos. A maioria dos transcritos primários sofrem múltiplos eventos de *splicing* e *splicing* alternativo. Os pequenos RNAs nucleares (RNAsn) são componentes de um complexo de pequenas ribonucleoproteínas (RNPs_n) (MANCHADO et al., 2006), podendo ser subdivididos em 5 tipos: U1, U2, U4, U5 e U6 (VALADKHAN, 2005). A maioria dos RNAsn são transcritos pela polimerase II, exceto o U6 RNAsn que é transcrito pela polimerase III (McNAMARA-SCHROEDER et al., 2001).

Em peixes, a utilização destes DNAs como marcadores citogenéticos é recente, sendo que os estudos foram realizados até então, somente com os DNAsn U1 e U2 e estão restritos a poucas famílias: Batrachoididae, Moronidae, Bagridae, Cichlidae, Haemulidae, Gymnotidae e Heptapteridae (MERLO et al., 2010; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; CABRAL-DE-MELO et al., 2012; SUPIWONG et al., 2013; UTSUNOMIA et al., 2014b e USSO, 2015).

A maioria dos estudos propõe que, durante o processo evolutivo o acúmulo dessas sequências de DNAsn em um único par cromossômico seja mais comum. Apenas duas espécies apresentaram, até o momento, a sequência de DNAsn U2 distribuída em mais de um par de cromossomos: *Gymnotus pantanal*, com seis pares (UTSUNOMIA et al., 2014b) e quatro populações de *Rhamdia quelen*, onde foram observados de cinco a seis cromossomos portadores desses sítios (USSO, 2015). No entanto, como ainda são escassos os estudos a respeito do mapeamento e localização dessas sequências, não é possível estabelecer uma proposta evolutiva conclusiva.

1.4 Localização de sítios de DNAs ribossômicos 18S e 5S em *Bryconamericus*

Após a utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sonda de DNAr 18S, Paintner-Marques et al. (2002b, 2003) confirmaram em *Bryconamericus aff. iheringii* apenas um par de cromossomos com cístrons ribossômicos e na população de *B. aff. exodon* foram evidenciadas oito marcações teloméricas, comprovando um sistema de RONS múltiplas.

Capistano et al. (2008) encontraram na população de *B. aff. iheringii* do Córrego Maringá citótipo I, seis sítios fluorescentes do qual quatro corresponderam aos cromossomos AgRONS. Na população do rio Kelller citótipo II, a FISH revelou dez sítios ribossomais que incluíram marcações AgRONS e na população do Córrego Tatupeba citótipo III, os sinais fluorescentes confirmaram apenas um par.

Em *Bryconamericus ecai* Santos et al. (2012) observaram uma variabilidade de cístrons de DNA ribossômico 18S nos citótipos I, III e IV que, em alguns casos, foram correspondentes às AgRONS, e no citótipo II foi confirmado um sistema simples de RONS.

Em uma população de *Bryconamericus aff. iheringii*, do ribeirão Três Bocas , a localização dos sítios de DNAr 18S confirmaram a presença de múltiplas RONS em cinco dos seis citótipos analisados, bem como a RON simples no citótipo I (SILVA et al. 2014). Com a utilização da sonda de DNAr 18S, Piscor et al. (2013) confirmaram um sistema de RONS simples para *B. stramineus* e *Bryconamericus cf. iheringii*, no entanto *B. turiuba* apresentou 4 cromossomos com sítios de DNAr 18S, confirmando um sistema múltiplo para esta última espécie. Na tabela 1 estão relacionadas todas as análises com FISH, utilizando sondas de DNAr 18S, em diferentes espécies e populações de *Bryconamericus* relatando a variabilidade desses sítios nesse grupo de peixes.

O mapeamento de sítios de DNAr 5S foi realizado, até o momento, em apenas três espécies por Piscor et al., 2013 (tabela 1). Esses autores constataram a presença de sítios simples para *Bryconamericus cf. iheringii* e *B. stramineus*, localizadas na região terminal e pericentromérica respectivamente, enquanto em *B. turiuba* foram confirmados dois pares de cromossomos portadores dos sítios, na região pericentromérica.

1.5 Análise integrativa de sequência de DNA mitocondrial e citogenética

Atualmente vem se tornando cada vez mais comum, a utilização de diferentes técnicas em conjunto para a identificação de espécies. De acordo com Hebert et al. (2003), em muitos casos a identificação morfológica dos organismos é muito difícil, tanto pela variação fenotípica bem como pela variabilidade genética nos caracteres utilizados, quanto pela eficiência do uso de chaves morfológicas em apenas um estágio da vida de determinados animais.

O uso de marcadores moleculares tem se mostrado eficaz no estudo de identificação de espécies em diversos grupos de animais como borboletas (HEBERT et al., 2003a, 2004);

peixes australianos (WARD et al., 2005); microorganismos bentônicos (MARKMANN e TAUTZ, 2005); besouros (MONAGHAN et al., 2005); e peixes de água doce (MARQUES et al., 2013 e CASTRO et al., 2014).

O DNA mitocondrial (DNAm) é uma molécula que apresenta aspectos que favorecem a discriminação entre espécies próximas, tais como a herança materna, taxa de mutação de alguns genes alta quando comparado ao DNA nuclear e também a ausência de recombinação (MOORE, 1995; RUBINOFF, 2006), o que explica sua grande aplicação.

O DNA mitocondrial, na maioria dos animais, é uma molécula circular de DNA dupla hélice contendo, geralmente, os mesmos 37 genes, sendo eles: 13 genes codificadores de proteínas, 2 genes ribossomais, uma região não-codificante de proteínas chamada de região de controle (*D-loop*), que controla a replicação do DNA mitocondrial e 22 genes para RNA transportador (BOORE, 1999; WAUGH, 2007). DNAm é uma sequência bastante informativa para a resolução de questões de identificação de espécies, em especial quando as relações filogenéticas dizem respeito a táxons intimamente relacionados (MOORE, 1995; RUBINOFF, 2006).

Tautz et al. (2003) sugeriram a análise da diversidade genética a partir dos estudos de sequências de segmentos de DNA e, somente a partir da metodologia proposta e padronizada por Hebert et al (2003), na qual esse autores propuseram a criação de um sistema universal de diagnóstico, com um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), do gene citocromo *c* oxidase 1 (CO1), o qual foi denominado DNA barcoding, características confiáveis foram apresentadas para que um sistema de identificação eficiente fosse implementado. Desde então, diversos trabalhos foram realizados com base nesta técnica em diferentes grupos de animais, como em borboletas (HEBERT et al., 2004) e peixes (WARD et al., 2005; CARVALHO et al., 2013).

No mapeamento de sequências repetitivas de DNAr 18S e 5S, Histonas H1, H3 e H4 e Rex 3, em exemplares de *Astyanax bockmanni* de duas diferentes bacias hidrográficas Silva et al. (2013), observaram diferenças entre as fórmulas cariotípicas bem como no número e localização de alguns sítios de DNAs repetitivos. No entanto, a análise dos resultados de DNAm, demonstrou que todos exemplares pertenciam à referida espécie.

Marques et al. (2013), realizaram análises citogenéticas e genéticas de 35 exemplares de traíras, todas identificadas como pertencentes à espécie *Hoplias malabaricus*, ao longo de um trecho de aproximadamente 350 km no canal principal do baixo rio Amazonas, no Pará. Todos os exemplares apresentaram o mesmo número diplóide e mesma fórmula cariotípica no entanto, com a análise do gene do DNAm esses autores puderam separar populações de *Hoplias malabaricus* do Brasil (Gp 2-6) e Argentina (Gp1), bem como o haplótipo I, classificado como *H. intermedius*. No entanto, não foi possível a distinção das populações brasileiras de bacias hidrográficas diferentes como São Francisco e Rio Amazonas, mantendo os indivíduos dessas populações próximos.

Em estudos de Pansonato-Alves et al. (2013), a ferramenta de identificação molecular CO1, foi utilizada para a diferenciação entre dois distintos cariomorfos, de uma população de *Astyanax fasciatus*, um com $2n=46$ e outro com $2n=48$. A localização dos sítios de DNAs repetitivos e a análise da sequência do gene CO1 confirmaram a diferenciação genética dos cariomorfos e a existência de dois grupos de *A. fasciatus* vivendo em simpatria, apesar da baixa taxa de divergência genética encontrada para o gene, a qual podem ser devido a uma baixa taxa de mutação para este gene, neste grupo, ou até mesmo a um processo de radiação evolutiva recente nestas linhagens (Pansonato-Alves et al., 2013), como já foi proposto para outros grupos de peixes (Montoya-Burgos, 2003) e também no gênero *Astyanax* (Ornelas-Garcia et al., 2008; Pereira et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando a ocorrência de diferentes citótipos e polimorfismo de sítios de DNAs ribossômicos no gênero *Bryconamericus*, o presente trabalho tem por objetivo geral a análise e localização de diferentes sequências de DNAs repetitivos em diferentes populações de *Bryconamericus*, visando melhor compreender sua estrutura genética e organização cariotípica, inferindo sobre as tendências evolutivas que possam estar ocorrendo neste grupo de peixes.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer número diplóide, fórmula cariotípica e localização das Ag-RONs em diferentes populações de *Bryconamericus*;
- Localizar sítios de DNAs ribossômicos 5S, 18S e de DNAsn U2.
- Realizar a identificação molecular das espécies por meio da análise da porção 5' do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade 1 (CO1) e avaliar a eficácia do DNA barcode na diferenciação entre os exemplares analisados
- Comparar os resultados obtidos com os da literatura, procurando compreender melhor a organização e evolução cromossômica deste gênero, tido como um grupo polifilético e, desta forma, poder contribuir na análise citotaxonômica deste grupo de peixes.

3 LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS

3.1 Locais de coleta

No presente estudo foram analisadas quatro populações de *Bryconamericus* coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paraná e do Sistema Hidrográfico da Laguna dos Patos (Tabela 2; Figura 1).

A Bacia do Paraná é uma região sedimentar ampla do continente sul-americano que inclui porções territoriais do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, totalizando uma área que se aproxima dos 1,5 milhão de quilômetros quadrados (MILANI et al., 2007). Segundo Paiva et al (2002), a bacia do rio Paraná é uma das grandes bacias hidrográficas do Brasil, cobrindo uma área de 891.309 Km² que equivale à 10,5% do território nacional. Está situada nas regiões sudeste, sul e centro-oeste, abrangendo principalmente os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Goiás, bem como o Distrito Federal.

Composta por 16 bacias hidrográficas menores: Bacia Litorânea, Bacia do Ribeira, Bacia do Cinzas, Bacia do Iguazu, Bacias do Paraná 1, 2 e 3, Bacia do Tibagi, Bacia do Ivaí, Bacia do Piquiri, Bacia do Pirapó, Bacia do Itararé, Bacias do Paranapanema 1, 2, 3 e 4 (MILANI et al., 2007).

O curso do Rio Paraná pode ser dividido em Paraná Superior, que inclui desde a nascente do Rio Paranaíba até a confluência com o Rio Grande; Alto Paraná, estendendo-se desde a confluência até o Salto das Sete Quedas (reservatório da UHE de Itaipu); Médio Paraná, incluindo desde o Salto das Sete Quedas até o rápido de Apipé; Baixo Paraná, que inclui desde o rápido Apipé até a cidade argentina de Paraná e Paraná Inferior, estendendo-se desde a cidade de Paraná até a desembocadura no rio da Prata (PAIVA et al., 2002).

A Laguna dos Patos é a maior laguna litorânea localizada na América do Sul (TOLDO et al., 2006), estendendo-se por aproximadamente 240km com uma largura média de 40km, localizada paralelamente à costa Atlântica do estado do Rio Grande do Sul. A única saída para o Oceano Atlântico fica situada no extremo meridional da laguna, na cidade de Rio Grande. A Laguna dos Patos recebe uma contribuição de água doce de uma área de drenagem que cobre a metade do Estado do Rio Grande do Sul (TOLDO et al., 2006).

É um importante recurso hídrico devido à sua dimensão e conexão com o mar, sendo um local útil tanto para o turismo quanto para o lazer, servindo também como refúgio e reprodução de diversas espécies animais (CARVALHO et al. 2005). Pessano et al. (2005) e Azevedo et al. (2003) ressaltam também a relevância da Laguna dos Patos pela formação de arroios e riachos e por estes serem locais utilizados na reprodução de espécies que habitam leitos maiores de rios. Apesar de sua fundamental importância, esse sistema hidrográfico, muitos rios ou mesmo micro-bacias que o compõem ainda não são estudadas e, provavelmente, estes locais abrigam novas espécies e informações consideráveis do ponto de vista científico (RIBEIRO E KÖHLER, 2007).

3.2 Espécies estudadas

Bryconamericus ecai

Foram analisados 9 espécimes (3 fêmeas, 4 machos e dois com sexo indeterminado) de *Bryconamericus ecai* (localidade-tipo em Venâncio Aires / RS), do rio Forquetinha (afluente da Laguna dos Patos) município de Canudos do Vale – RS (Tabela 2). Os exemplares estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob o número MZUEL 9390.

Bryconamericus sp.

Foram analisados 24 exemplares (15 fêmeas, 7 machos e 2 de sexo indeterminado) de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho (afluente do rio Tibagi), município de Rolândia e do rio Cambuta (afluente do rio Ivaí), município de Borrazópolis (Tabela 2). Os exemplares estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob os números MZUFRGS 17440 e 17426, respectivamente.

Bryconamericus aff. *iheringii*

Foram analisados 14 exemplares (7 fêmeas, 7 machos) de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do Ribeirão Três Bocas (afluente da bacia do Rio Tibagi) município de Londrina – PR (Tabela 2). Os espécimes estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) sob os números MZUEL 5775 e MZUEL 5776.

Figura 1 - Locais de coleta e espécies estudadas. a) mapa do Brasil indicando os estados onde foram realizadas as coletas; mapa ampliado indicando os locais de coleta nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná; b) *Bryconamericus* sp rio Cambuta; c) *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho; d) *Bryconamericus ecai*; e) *Bryconamericus* aff. *iheringii*.

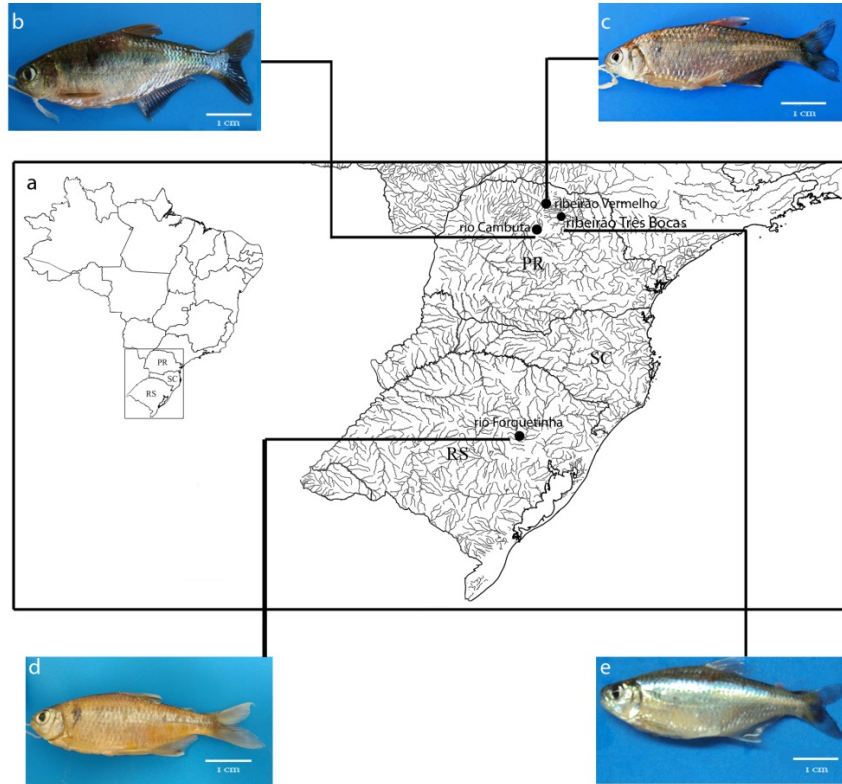


Tabela 1 - Dados citogenéticos em espécies de *Bryconamericus*. 2n = Número diploide, NF = Número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, t = terminal, pc = pericentromérico, c = centromérico, i = intersticial, p = braço curto, q = braço longo, BC= Banda C, RF= Referência.

Espécies	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	NF	AgRONS	DNAr 18S, 28S or 45S	DNAr 5S	BC	RF
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>exodon</i>	ribeirão Três Bocas-PR	52	16m+12sm+6st+18a	86	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	-	-	1
	ribirão Três Bocas-PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	-	-	1
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	rio Água da Floresta –PR	52	8m+22sm+10st+12a	92	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	-	t, c.	2
	córrego Maringá – PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	2-4 (t. p sm)	6 (t. p sm)	-	-	3
	rio Keller-PR	52	8m+28sm+6st+10a	94	2-4 (t. p st)	10 (t. p sm, st)	-	t, pc.	3
									4
	córrego Tatupeba-PR	52	8m+20sm+8st+16a	88	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	-	-	3
	rio Keller-PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	-	-	t, pc.	4
	ribeirão Três Bocas-PR	52	12m+16sm+10st+14a	90	-	-	-	-	5
	ribeirão Três Bocas-PR	52	14m+18sm+10st+10a	94	-	-	-	-	5
	ribeirão Três Bocas-PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	-	-	-	5
	ribeirão Três Bocas-PR	52	10m+14sm+8st+20a	84	-	-	-	-	5
	ribeirão Três Bocas-PR	52	12m+10sm+16st+14a	90	2 (t.p st)	2 (t.p st)	-	-	6
	ribeirão Três Bocas-PR	52	18m+14sm+10st+10a	94	2-4 (t.p m, q. m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	-	-	6
	ribeirão Três Bocas-PR	52	20m+18sm+4st+10a	94	2-5 (t.p m, q m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	-	-	6
	ribeirão Três Bocas-PR	52	20m+14sm+12st+6a	98	2-3 (t.p m, q sm, st)	4 (t.p m, q sm, st)	-	-	6
	ribeirão Três Bocas-PR	52	22m+18sm+8st+4a	100	3-4 (t.p m, q sm, st)	4-6 (t.p m, q sm, st)	-	-	6
ribeirão Três Bocas-PR	52	18m+24sm+6st+4a	100	3-5 (t.p m, q m,sm)	4-6 (t.p m, q m,sm)	-	-	6	
<i>Bryconamericus</i> cf. <i>iheringii</i>	rio Corumbataí-SP	52	10 m +14sm+18st+10a	94	2 (t. p a)	2 (t. p a)	2 (p.p a)	c, pc.	12

Boulenger, 1887

<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann, 1908	rio Mogi-Guaçu-SP	52	26m/sm+26st/a	78	-	-	-	-	7
	córrego Guaçu-MS	52	6m+10sm +16st+20a	84	2 (t. p st)	2 (t. p st)	2 (p.q sm)	c, pc.	12
<i>Bryconamericus ecai</i> Silva, 2004	rio Forquetinha –RS	52	10m+10sm+8st+24a	80	2-4 (t. p m, sm, st, a; q sm)	4 (t. p m, a; q sm)	-	pc.	8
	rio Forquetinha –RS	52	10m+14sm+12st+16a	88	2 (t. p st)	2 (t. p st)	-	pc.	8
	rio Forquetinha –RS	52	14m+12sm+8st+18a	86	2-3 (t. p sm, a)	6 (t. p m, sm, st, a; q sm)	-	pc.	8
	rio Forquetinha –RS	52	10m+24sm+14st+4a	100	2-3 (t. p sm, st)	2 (t. p m, st)	-	t, c, i.	8
<i>Bryconamericus turiuba</i> Langeani et al. 2005	rio Passa Cinco-SP	52	8 m +10sm +14st +20a	84	2 (t. p st)	4 (t. p st)	4 (p. q a)	c, pc.	12
<i>Bryconamericus</i> sp. A	rio Piracicaba-SP	52	6m+30sm+6st+10a	94	2-3 (t. p sm, st)	-	-	t, c, i, pc.	9; 10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. B	rio Piracicaba-SP	52	10m+6sm+18st+18a	86	1-3 (t. p sm, st)	-	-	t, c, pc.	9
	rio Piracicaba-SP	52	6m+10sm+20st+16a	88	1-3 (t. p sm, st)	-	-	t, pc., i.	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Ribeirão Três Bocas-PR	52	6m+18sm+14st+14a	90	1-4 (t. p m, sm, a; q sm, st)	-	-	t, c, i.	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. D	córrego Avoadeira –MT	52	8m+14sm+16st+14a	90	1-4 (t. p st, a)	-	-	t, c, i.	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. E	córrego Avoadeira –MT	54	10m+16sm+22st+6a	102	-	-	-	t, c, i, pc.	10

1- Paintner-Marques et al. (2002b); 2- Paintner-Marques et al. (2003); 3- Capistano et al. (2008); 4- Portela-Castro et al. (2008); 5- Eberhardt et al. (2012); 6- Silva et al. (2014); 7- Portela et al. (1988); 8- Santos et al. (2012); 9- Wasko et al. (1996); 10- Wasko and Galetti Jr. (1998); 11- Wasko and Galetti Jr. (1999); 12- Piscor et al. (2013).

Tabela 2 - Locais de coleta e espécies analisadas de *Bryconamericus*

Espécie	Nº de indivíduos	Locais de coleta	Bacia
<i>Bryconamericus ecai</i> MZUEL 9390	9 3♀/ 4♂/2?	rio Forquetinha 29°24'22.4"S/52°03'19.2"W	Laguna dos Patos - RS
<i>Bryconamericus</i> sp. MZUFRGS 17440	12 9♀/2♂/1?	ribeirão Vermelho 23°13'0,95"S/51°20'0,88"W	bacia do Paraná/PR
<i>Bryconamericus</i> sp. MZUFRGS 17426	8 5♀/3♂	rio Cambuta 23°53'19.04"S/51°35'28,3"W	bacia do Paraná/PR
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i> MZUEL 5775 e 5776	14 7♀/7♂	ribeirão Três Bocas 23°23'06.6"S/51°04'35.8"W	bacia do Paraná/PR

CAPÍTULO 1

Organização cariotípica, e mapeamento de três classes de DNAs repetitivos do gênero *Bryconamericus* (Characidae): utilização de DNA barcoding na diferenciação entre populações.

* Este artigo foi submetido à publicação à revista *Reviews in Fish Biology and Fisheries*

RESUMO

A localização de sítios de DNAs repetitivos, por hibridação fluorescente *in situ*, tem sido amplamente utilizada para estudos cariotípicos em diferentes espécies de peixes, principalmente no que diz respeito a espécies relacionadas ou mesmo gêneros que apresentem grande variabilidade cromossômica. Neste trabalho foram analisadas três espécies de *Bryconamericus* e todas apresentaram número diplóide de 52 contudo, com diferentes fórmulas cariotípicas. *Bryconamericus ecai* do rio Forquetinha/RS apresentou três novos citótipos, aumentando para sete o número de formas cariotípicas nesta população. No entanto, nas outras duas populações estudadas de *Bryconamericus* sp. rio Vermelho/PR e rio Cambuta/PR, foi observada apenas variação interpopulacional. O mapeamento cromossômico dos sítios de DNAr 18S e 5S evidenciou distintas marcações entre as três populações, mostrando uma variabilidade inter e intrapopulacional para ambos genes, todos localizados na região terminal dos cromossomos. A análise molecular por DNA barcoding, complementando as análises citogenéticas, também diferenciou as três populações. A sequência de DNA repetitivo DNAsn U2 foi localizada na região intersticial de um único par de cromossomos, variando em relação ao par cromossômico portador dessa sequência, sendo este o primeiro relato para o gênero *Bryconamericus*. Os dados apresentados evidenciaram uma variabilidade cariotípica já característica para o gênero, acompanhada por polimorfismo de sítios ribossômicos, o que demonstra que esse grupo de peixes pode estar sofrendo um processo evolutivo divergente, sendo um modelo interessante para estudos de evolução cromossômica.

Palavras-chave: citogenética de peixes, citogenética molecular, DNA ribossomal, DNAsn U2, polimorfismo cariotípico

INTRODUÇÃO

Uma grande parte do genoma eucarioto é composto de sequências de DNAs repetitivos, incluindo famílias multigênicas, satélites, microssatélites e elementos transponíveis (Jurka et al. 2005). A natureza repetitiva dessas seqüências caracteriza-as como bons marcadores para mapeamento físico cromossômico, uma vez que permite aumentar o conhecimento sobre a estrutura do genoma e sua organização (Silva et al. 2013). O mapeamento físico destas sequências repetitivas também têm sido aplicado para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade e evolução da ictiofauna, revelando aspectos sobre a composição da cromatina, a ocorrência de rearranjos cromossômicos, entre outros eventos que podem esclarecer questões como o processo de diferenciação das espécies (Ferreira et al. 2010).

Apesar de serem considerados importantes e úteis marcadores cromossômicos, os dados com sondas de DNAs repetitivos ainda são muito escassos em peixes, se restringindo mais à localização de genes de RNAs ribossomais 18S e 5S (Vicari et al. 2008; Traldi et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013b; Silva et al. 2014). Entretanto, tem aumentado nos últimos anos os dados acerca de outros DNAs repetitivos, como por exemplo, histonas e elementos transponíveis (Hashimoto et al. 2011; Hashimoto et al. 2012; Pansonato-Alves et al. 2013; Silva et al. 2013, 2014).

Os RNAs nucleares pequenos (RNAsn) estão associados a um complexo de pequenas ribonucleoproteínas (RNPsn) fazendo parte de uma família multigênica de DNAs não codificantes que compõem o spliceossomo, sendo eles: U1, U2, U4, U5 e U6 (Manchado et al. 2006). São altamente conservados e desempenham um papel crucial no processo de splicing (Valadkhan 2005). Os estudos de mapeamento físico destes genes em peixes são poucos e se restringem à utilização da sonda de DNAsn U2 (Merlo et al. 2010; Úbeda-

Manzanaro et al. 2010; Supiwong et al. 2013). Em peixes neotropicais, o único trabalho realizado até o momento foi de Utsunomia et al. (2014), em 6 espécies de *Gymnotus*.

Atualmente, existem 93 espécies descritas para o gênero *Bryconamericus*, objeto deste estudo, distribuídas pela região Neotropical (Eschemeyer, 2016). Devido à falta de evidências no monofiletismo entre as espécies da subfamília Tetragonopterinae, Lima et al. (2003), listaram 88 gêneros como *Incertae sedis*, incluindo *Bryconamericus*. Em recentes estudos morfológicos de Mirande (2010) e genéticos de Oliveira et al. (2011) *Bryconamericus* faz parte de um grupo polifilético e pertence à subfamília *Stevardiinae*, em Characidae.

Ainda são poucas as espécies do gênero *Bryconamericus* com descrição cariotípica entretanto, o número diplóide de 52 parece ser relativamente conservado, levando em consideração a ocorrência de variações cariotípicas, resultando na formação de citótipos em diferentes populações (Capistano et al 2008, Santos et al 2012, Eberhardt et al 2012 e Silva et al 2014).

Outra característica do grupo é a ocorrência de variabilidade de sítios de DNAr 18S, sendo encontrados múltiplos como já relatado por Santos et al. (2012) e Silva et al. (2014), bem como um único par cromossômico portador do cístron ribossomal (Capistano et al. 2008, Santos et al 2012, Piscor et al. 2013 e Silva et al. 2014). O único estudo com a localização cromossômica de DNAr 5S em *Bryconamericus* foi realizado por Piscor et al. (2013), já sendo verificada variação entre as três espécies estudadas pelos autores.

A análise do DNA mitocondrial (DNAm_t) tem sido amplamente utilizada em análise genética para diversos grupo animais, devido à rápida dinâmica evolutiva desse DNA, se comparado ao DNA nuclear, o que resulta na acumulação de mutações que podem levar a diferenciação entre espécies estreitamente relacionadas (Rubinoff, 2006; Moore, 1995). O ritmo acelerado na mudança na sequência do gene de DNAm_t resulta em diferenças entre populações que foram separadas por recentes períodos de tempo (Hebert et al 2004).

Recentemente, Silva et al (2013), Marques et al (2013) e Pansonato-Alves et al. (2013b), realizaram trabalhos integrando os resultados obtidos na citogenética com dados de DNAm em diferentes espécies de peixes.

Considerando que existem poucos dados de DNAs repetitivos em *Bryconamericus* e que esses marcadores são bastante úteis para a caracterização de parte do genoma dos peixes, principalmente em gêneros que apresentem variabilidade na macro e micro estrutura cariotípica, o objetivo desse trabalho foi analisar a organização cariotípica e o mapeamento cromossômico de três classes de DNAs repetitivos (DNAr 18S e 5S, DNAsn U2). Além disso, foi também realizada a análise da sequência do CO1 a fim de confirmar se as amostras analisadas apresentaram divergência genética significativas entre as três populações de *Bryconamericus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico:

No presente estudo foram analisados 9 exemplares de *Bryconamericus ecai* Silva (2004) sendo, 4 machos, 3 fêmeas e 2 com sexo não identificado, coletados no rio Forquetinha, Canudos do Vale-RS-Brasil (20°21'43.5"S/52°03'18.3"W) pertencente ao sistema hidrográfico da Laguna dos Patos – RS. Quinze exemplares de *Bryconamericus* sp, 3 machos, 10 fêmeas e 2 com sexo não identificado, do rio Vermelho, município de Rolândia-PR-Brasil (23°13'0.95"S/51°20'0.88"W), pertencente à bacia do rio Tibagi. E nove exemplares de *Bryconamericus* sp., 4 machos e 5 fêmeas, do rio Cambuta no município de Borrazópolis-PR-Brasil (23°53'9.65"S/51°35'28.3"W), bacia do rio Ivaí.

Análise Citogenética Convencional

A mitose foi estimulada por injeção de suspensão de levedura nos animais, como descrito por Lee e Elder (1980). Os cromossomos mitóticos foram obtidos por preparação direta, removendo o rim anterior, de acordo com a metodologia proposta por Bertollo et al. (1978) e para análise convencional as lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6.8. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964), com modificações. Para determinação do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) foram considerados portadores de dois braços e os acrocêntricos (a) um braço. As regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) foram detectadas pela técnica de impregnação de nitrato de prata segundo Howell e Black (1980).

Obtenção e marcação das sondas para hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

A sonda de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Hatanaka e Galetti, 2004) foi marcada com biotina-14-dATP por nick translation; a sonda de DNAr 5S foram marcadas por PCR utilizando o nucleotídeo digoxigenina-11-dUTP 1mM (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Para a reação de 25µl foram utilizados: 2,5 µl de 10X PCR Buffer; 2 µl de DNA de *Imparfinis schubarti* (Gomes, 1956), Heptapteridae a 20ng/µl; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 2mM cada; primers a 10µM; MgCl₂ (50 mM); Taq polimerase a 5U/µl e água para completar a reação.

Para a detecção e amplificação da sonda de DNAr 18S foram utilizados 5 µl de avidina-FITC (0,5 mg/ml) e 45 µl BSA (5%) e 40 µl de solução de amplificação (1 ml anti-avidina-biotina conjugada e 39 ml 1x PBS) e os cromossomos foram corados com iodeto de propídeo.

A sonda de DNAr 5S foram detectadas com 90 µl de PBS 1x, 10 µl de BSA (5%) e 0,5 µl de antidigoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), conforme indicação do fabricante e as lâminas foram contra-coradas com 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI).

Para a realização da double FISH (DNAr 18S e de DNAsn U2) e para a hibridação *in situ* de DNAsn U2, isoladas de *Eigenmannia virescens* (Valenciennes, 1836), as sondas foram marcadas por PCR com biotina-16-dUTP e o sinal foi detectado com avidina-FITC (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ou foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e o sinal detectado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

A hibridação fluorescente *in situ* foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986). As imagens foram capturadas com câmera digital Moticam Pro 282B acoplada ao fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B ou câmera Olympus (DP70) acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX61.

Análise genética

Sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase subunidade 1 (CO1) foram obtidas, a fim de confirmar se as amostras apresentaram divergência genética significativa. Para a amplificação do gene CO1 - (~ 650 pb), foram utilizados os primers FishF1-5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC3' e FishR1-5'TAG ACT TCT GGG TGG AAG CCA AAT CA3' (Ward et al 2005). A PCR foi realizada utilizando o programa: desnaturação inicial de 5 min a 94 ° C; 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 54 ° C durante 30s e 72 ° C durante 1 minuto, com uma extensão final a 72° C durante 10 min no termociclador MJ Research PTC-100. Cada reação foi realizada em um volume final de 10 µl com 1x PCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), 0,4 µM de primers FishF1 e FishR1, aproximadamente, 15 ng de DNA e água para completar o volume. Após a amplificação, os produtos foram

visualizados em gel de agarose a 1% (2 µl de amostra, 2 µl de tampão de carga e coradas com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Após a análise do gel, o restante do produto amplificado foi purificado com a adição de 0,5µl de Illustra™ Exostar™ 1-Step (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) seguindo as recomendações do fabricante e a PCR foi realizada com desnaturação inicial de 3 min a 95 ° C; 35 ciclos de 95° C durante 15 s, 54° C durante 15s e 60° C durante 2 minutos, com uma extensão final a 60° C durante 1 min no termociclador MJ Research PTC-100. Cada reação foi realizada em um volume final de 10 µl com Enzima Big Dye (diluída 4x), tampão 5x, 0,4 µM de primers FishF1 e FishR1, 15 ng de DNA e água para completar o volume. Enviado para a sequenciamento, onde as duas cadeias foram sequenciadas em reações independentes, de acordo com as recomendações do protocolo descrito por Hajibabaei et al. (2005), para a identificação molecular. O sequenciamento foi realizado em sequenciador 3500 ABI XL automatizado (Applied Biosystems Inc., CA, EUA).

As sequências obtidas de ambas as fitas *forward* e *reverse* , com o tamanho de aproximadamente 600 pb foram combinadas para formação de um consenso pelo aplicativo online Electropherogram Quality Analysis (Togawa e Brigido, 2003).

As sequências de consenso foram submetidas à base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLASTn para verificar a correspondência e similaridade das sequências submetidas com as armazenadas no banco de dados, as quais foram consideradas significativas às correspondências superiores a 98% com distância intraespecífica inferior a 2%.

As sequências com as melhores correspondências foram incorporados na análise da distância genética intra e inter-específica com base no modelo de Kimura-2-parâmetro (K2P) (Kimura, 1980). O mesmo modelo foi utilizado para construir a árvore de distância com o método de Neighbor-Joining (NJ) para uma representação gráfica da distribuição de distâncias

genéticas entre populações. As análises de distância genética e a árvore NJ foram feitas por MEGA v6 (Tamura et al 2013). Após as análises, as sequências foram depositadas no banco de dados do NCBI (KU556593-KU556608).

RESULTADOS

Bryconamericus ecai – rio Forquetinha

Todos os indivíduos apresentaram número diplóide igual a 52 sendo observadas diferenças na fórmula cariotípica. Nos exemplares de *Bryconamericus ecai* foram encontrados três novos citótipos, dando continuidade aos trabalhos realizados por Santos et al (2012), aumentando para sete o número de citótipos encontrados nesta localidade: citótipo V (dois indivíduos), com fórmula cariotípica (FC) igual a $8m+16sm+14st+14a$ e número fundamental (NF) igual a 90 (Figura 1.1a); citótipo VI (dois indivíduos) com $FC=10m+16sm+8st+18a$ e $NF= 86$ (Figura 1.1b); citótipo VII (5 indivíduos) apresentou $FC=8m+18sm+10st+16a$ e $NF=88$ (Figura 1.1c).

No citótipo V as AgRONS foram observadas na região terminal do braço curto de três cromossomos, sendo um do par 5 e no par 23 (Figura 1.2a – box). A FISH usando a sonda de DNAr 18S, evidenciou marcações coincidentes com as RONS e no braço longo de um cromossomo acrocêntrico do par 20 (Figura 1.2a). Os sítios de DNAr 5S foram observados na região terminal do braço curto dos pares 24 e 25 e o par 5 sintênico com o DNAr 18S (Figura 1.3a). A sonda de DNAsn U2 evidenciou o par 14 como o portador do sítio na região intersticial do braço longo (Figura 1.3a – box).

No citótipo VI as AgRONS foram observadas em três cromossomos: no braço curto de um cromossomo do par 1 e do par 24 e no braço longo de um cromossomo do par 6 (Figura 1.2b – box). Utilizando a técnica de FISH foi possível observar uma variação

intraindividual dos sítios de DNAr 18S sendo detectados nos pares 7, 9, 15, 24, 25 bem como em um cromossomo dos pares 1, 6 e 13 (Figura 1.2b e box). Os cístrons de DNAr 5S foram observados em quatro pares de cromossomos, sendo eles os pares 7, 18, 23 e 24 (Figura 1.3b), apresentando sintenia entre os sítios 18S e 5S nos pares 7 e 24. O DNAsn U2 foi evidenciado na região intersticial do braço curto do par 9 (Figura 1.3b - box), sendo este sintênico ao sítio de DNAr 18S.

No citótipo VII, as AgRONS, foram observadas em 3 cromossomos dos pares 5, 6 e 16 (Figura 1.2c – box). A FISH identificou DNAr 18S nos pares 5, 6, 16 (coincidentes com as AgRONS), além do par 22 no braço curto e em um cromossomo dos pares 1 e 19, no braço longo (Figura 1.2c). Os sítios de DNAr 5S foram detectados na região terminal do braço curto dos pares 6, 24, 26 e em um cromossomo do par 7 (Figura 1.3c). Foi observada sintenia no par 6 entre os sítios de DNAr 18S e 5S. O sítio de DNAsn U2 foi localizado na região intersticial do par 8 (Figura 1.3c box).

***Bryconamericus* sp – ribeirão Vermelho**

Todos indivíduos apresentaram 52 cromossomos com $FC = 16m+14sm+10st+12a$ e NF igual a 92 (Figura 1.1d). Utilizando as técnicas de impregnação por nitrato de prata e a FISH com sondas de DNAr 18S e 5S foi possível diferenciar dois grupos nos indivíduos dessa localidade, Grupo 1, com dois exemplares, apresentou constrição secundária no par 23 positiva para AgRON e sonda de DNAr 18S, além do par 25 com marcação terminal no braço longo (Figura 1.2d – box). Três pares de cromossomos 11, 22 e 24 apresentaram os sítios de DNAr 5S (Figura 1.3d).

O grupo 2 dessa localidade, formado pelos demais indivíduos, apresentou até 5 cromossomos portadores de AgRONS (Figura 1.2d) e com a sonda de DNAr 18S foi possível observar 8 pares de cromossomos marcados sendo os pares 3, 4, 5, 9 e 21 com marcações na

região terminal do braço curto; os pares 2 e 17 na região terminal do braço longo e o par 8 com marcação intersticial (Figura 1.2d e destaque). Foi observada uma constrição secundária no par 25 (Figura 1.2d) desses indivíduos, que apresentou-se negativa tanto para AgRON como para o sítio de DNAr 18S. Os sítios de DNAr 5S foram detectados na região terminal do braço curto nos pares 4 e 5 e na região terminal do braço longo em um cromossomo dos pares 7 e 21 (Figura 1.3e), apresentando sintenia do sítio de DNAr 18S e 5S neste último cromossomo.

Utilizando a sonda de DNAsn U2, foi possível observar a presença de marcação no par 12 nos indivíduos do grupo I e no par 24, nos indivíduos do grupo II (Figuras 1.3d, e, respectivamente), ambos localizados na região intersticial do braço curto.

***Bryconamericus* sp. - rio Cambuta**

Todos indivíduos apresentaram $2n=52$ com $FC=2m+10sm+20st+20a$ e $NF=84$ (Figura 1.1e). Foram observados 3 cromossomos portadores das AgRONs (figura 1.2 e box), coincidentes aos sítios de DNAr 18S, os quais se mostraram localizados no par 3 com marcação terminal no braço longo e nos pares 21 e 23 com marcações terminais no braço curto (Figura 1.2e). Nesta população foi realizada a Double FISH utilizando a sonda de DNAr 18S e de DNAsn U2 e apenas o par 4 apresentou sítio de DNAsn U2, na região intersticial, não havendo sintenia entre estas duas sequências (Figura 1.2e). Utilizando a sonda de DNAr 5S foi evidenciado apenas o par 22, com marcação terminal no braço curto (Figura 1.3f).

A Figura 1.4 mostra um ideograma representando todos os citótipos com a localização das marcações observadas pelos bandamentos cromossômicos realizados nas três populações de *Bryconamericus* analisadas nesse estudo (Figura 1.4).

Análise molecular do Citocromo *c* oxidase subunidade 1 (CO1)

Um total de 16 sequências CO1 (596-598 pb) foram obtidas, e a composição de nucleotídeos foi de 32% T, 25,5% A, 25,6% C, 16,9% G, e não foram observadas inserções, deleções ou códons de parada. A média da distância genética intra-específica K2P foi inferior a 1% (Desvio Padrão (DP): 0,3%), sendo para a população de *Bryconamericus ecai* (0,3%, DP: 0,2%), de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho (0,4%, DP: 0,2%) e para *Bryconamericus* sp. do rio Cambuta (0,7%, DP: 0,2%). Foi observada uma distância genética K2P inter-específica significativa entre as populações. Comparações entre *B. ecai* e *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho, bem como entre, *B. ecai* e *Bryconamericus* sp. rio Cambuta, mostraram respectivamente 9,9% -10% (DP: 1,3%). Da mesma forma, *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho e do rio Cambuta apresentou 6,1% (DP: 1%) de genética distância genética inter-específica.

O padrão de distribuição de distâncias genéticas foi confirmada pela construção da árvore de Neighbor-Joining, o que nos permitiu observar uma diferença genética significativa entre as populações *Bryconamericus* (Figura 1.5). A árvore mostra três grupos diferentes, com todos os valores de bootstrap acima de 93%. Populações de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho e do rio Cambuta foram agrupados em dois grupos distintos, e formaram um grupo irmão com indivíduos de *B. ecai*. Apesar das diferenças citogenéticas observadas entre os espécimes de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho, separados em grupos 1 e 2, a análise do mtDNA não confirmaram esta variabilidade.

DISCUSSÃO

Todos os exemplares de *Bryconamericus* apresentaram 52 cromossomos, como já reportado por diversos autores em diferentes populações e/ou espécies (Tabela 1.1), sendo

observada a ocorrência de três novos citótipos em *B. ecai*, confirmando uma variabilidade cariotípica intrapopulacional, como anteriormente relatada por Santos et al. (2012), que observaram quatro outros citótipos. Variabilidade intrapopulacional semelhante já foi observada para *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Keller (Portela-Castro et al, 2008) e do ribeirão Três Bocas em estudos de Eberhardt et al. (2012) e Silva et al. (2014) . Em *Bryconamericus* sp rio Vermelho/PR e rio Cambuta/PR foi observada apenas variação cariotípica interpopulacional, como encontrado por Piscor et al. (2013) analisando três espécies de *Bryconamericus*, de diferentes populações.

A ocorrência de variações cariotípicas em *Bryconamericus* pode estar associada a processos de especiação simpátrica no caso de *B. ecai* e alopátrica no caso de *Bryconamericus* das três localidades, sendo esses processos comuns em espécies restritas a pequenos afluentes, como observado para populações de *Astyanax* do complexo *scabripinnis* estudadas por Vicari et al. (2008).

A população de *Bryconamericus* sp. rio Cambuta apresentou a maior diferença cariotípica em relação às outras duas espécies analisadas neste estudo e às listadas na Tabela 1.1, possuindo um pequeno número de cromossomos metacêntricos e diferenças significativas no número e localização de DNAr 18S e 5S. A análise do mtDNA também mostrou diferenças entre as populações de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho e rio Cambuta. As distâncias genéticas (K2P) entre estas duas populações foram seis vezes maior do que a distância genética intra-específica K2P, mostrando um barcoding-gap claro entre *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho e rio Cambuta. Esses valores são maiores do que média de barcoding-gap encontrados para fauna de peixes da bacia do alto rio Paraná (Pereira et al, 2011; 2013). Além disso, a árvore NJ mostra o conjunto bem formado tanto para o ribeirão Vermelho e rio Cambuta, quanto para as amostras e *Bryconamericus ecai*, bootstraps com altos valores de suporte para todos (93-100%, Figura 1.5). Dessa forma, pode-se inferir

que, apesar das espécies destas duas populações não terem sido descritas, o mais provável é que constituam espécies diferentes.

Os resultados obtidos dos sítios AgRONS e sítios de DNAr 18S confirmam a existência de múltiplas RONS, sendo essa uma característica para o grupo (Tabela 1.1). Nos três citótipos de *B.ecai* foi possível observar a presença de alguns cístrons ribossômicos 18S sem a marcação no seu homólogo, variabilidade essa não encontrada para as duas populações de *Bryconamericus* sp.

Os exemplares de *Bryconamericus* sp rio Vermelho (grupo 2) foram os que apresentaram maior número de cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S, assim como foi relatada pela primeira vez no gênero marcação intersticial para esse gene, diferenciando-se das demais populações deste trabalho e da literatura (Tabela 1.1).

Apesar de comum a presença de múltiplos sítios AgRONS no gênero, dois indivíduos de *Bryconamericus* sp rio Vermelho (grupo 1) apresentaram sítio simples heteromórficos, tratando-se portanto, de um heteromorfismo estrutural. Piscor et al. (2013) analisando *Bryconamericus* cf. *iheringii* da bacia do rio Corumbataí/SP também observaram um heteromorfismo de tamanho da RON no par 24, como no presente estudo, no entanto, com a aplicação da técnica de FISH o heteromorfismo não foi detectado.

Nos indivíduos do grupo 2 de *Bryconamericus* sp do rio Vermelho também foi observada uma constrição secundária no par 25 em algumas metáfases, não sendo coincidente com a AgRON ou sítios de DNAr 18S. Essas constrições tratam-se de pseudo-RONS, as quais são novas matrizes constituídas que se comportam, em muitos casos, como verdadeiras (Prieto e McStay 2008). Entretanto são transcricionalmente inativas, pois não existe a presença de um promotor, sem o qual não há como participar da síntese do pré RNAr (Mais et al. 2005).

As três espécies analisadas apresentaram sítios de DNAr 18S e 5S na região terminal dos cromossomos, o que poderia facilitar a transferência de material genético devido à sua proximidade no núcleo interfásico, promovido pela orientação dos cromossomos de acordo com o modelo de Rabl (Schweizer e Loidl 1987). Este fenômeno poderia explicar o heteromorfismo de tamanho no sítio de DNAr 18S em *Bryconamericus* sp. rio Vermelho (grupo 1), a ausência do sítio em alguns homólogos dos cromossomos portadores de cístrons ribossômicos, bem como a presença de alguns poucos blocos sintênicos e os sítios de DNAr 18S e 5S, este último corroborando com os resultados de Piscor et al. (2013) para uma população de *Bryconamericus* aff. *iheringii*.

A não homologia dos sítios de DNAr também pode ser devido à organização dos cromossomos durante a prófase, onde os cromossomos migram para uma área do núcleo, formando o chamado arranjo em bouquet, e os telômeros se ligam à membrana nuclear. Essa organização facilitaria a taxa de recombinação não homóloga em regiões pericentroméricas ou subteloiméricas aumentando, dessa forma, a chance de ocorrer troca de clusters de DNAr entre cromossomos não-homólogos (Cazaux et al 2011).

A presença de sítios de DNAr em apenas um dos cromossomos homólogos também pode ser resultado do tamanho dos sítios os quais, de tão pequenos, podem apresentar baixa fluorescência e não serem detectados, como observado por Santos et al (2012) e Ferro et al (2001).

Gross et al (2009) sugeriram que a natureza repetitiva dos elementos transponíveis pode ter facilitado os rearranjos cromossômicos, especialmente durante a configuração Rabl, levando a uma diferenciação na posição dos sítios de DNAr 5S em diferentes espécies do gênero *Symphysodon*. Este fato pode também ter ocorrido nas populações de *Bryconamericus* do presente estudo, apesar de não ter sido utilizado nenhum elemento transponível.

Os resultados encontrados com a sonda de DNAsn U2 em *Bryconamericus* são semelhantes aos de Merlo et al (2012) e Supiwong et al. (2013). No entanto, Utsonomia et al (2014) analisando diferentes espécies de *Gymnotus* observaram diversos cromossomos portadores desses sítios em *Gymnotus pantanal* e Úbeda-Manzanaro et al. (2010) analisando outras três espécies de peixes, encontraram sinais de DNAsn U2 amplamente espalhados pelo genoma.

Estes são os primeiros dados de mapeamento físico de sequências de DNAsn U2 em *Bryconamericus*, os quais mostraram-se bastante conservados no cariótipo das populações, diferente dos DNAs ribossômicos analisados. No entanto, ainda é prematuro definir um padrão de distribuição dessa sequência nesse grupo de peixes.

O presente estudo mostrou variabilidade cariotípica já característica para o gênero *Bryconamericus* acompanhada por um evidente polimorfismo de sítios de DNAr 18S e 5S (Fig. 4), e uma diferenciação populacional observada na árvore filogenética do gene CO1. As análises demonstram que esse grupo de peixes pode estar sofrendo um processo evolutivo divergente ou ainda que essa variabilidade seja reflexo da natureza polifilética do grupo, caracterizando este gênero como modelo interessante para estudos de evolução cromossômica na ictiofauna neotropical.

REFERÊNCIAS

- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics 1: 103-120
- Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta AO, Santos MH, Nogaroto V, Vicari MR, Almeida MC, Artoni RF. (2014) Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. Rev Fish Biol Fisheries. Doi 10.1007/s11160-014-9377-3
- Capistano TG, Portela-Castro ALB, Julio Jr HF. (2008) Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. Genet. Mol. Biol 31: 203–207

Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP, Britton-Davidian J. (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evolutionary Biology* 11:124

Eberhardt GN, Silva LLL, Santos AR, Dias AL. (2012) Occurrence of cytotypes and variability of AgNORs in a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). *Cytologia* 77: 507-513

Eschmeyer, W.N. **Catalog of fishes**. 2016. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

Ferreira IA, Poletto AB, Kocher TD, Mota-Velasco JC, Penman DJ, Martins C. (2010) Chromosome Evolution in African Cichlid Fish: Contributions from the Physical Mapping of Repeated DNAs. *Cytogenet Genome Res* 129: 314–322

Ferro DAM, Néo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55 – 62

Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E. (2009) Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Res* 127:43–53

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F. 2011. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res*. 134:64–71

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F. (2012) Cytogenetic Mapping of H1 Histone and Ribosomal RNA Genes in Hybrids between Catfish Species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenet Genome Res* 139:102–106

Hatanaka T, Galetti Jr PM. (2004) Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239 – 244

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2(1):312

Howell WM, Black DA. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with the protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* 36: 1014 – 1015

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110: 462–467

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(1330): 111–120

- Lee MR, Elder FFB. (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytogenet. Cell Genet* 52: 36-40
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, da Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena ZMS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF. (2003) Genera *Incertae sedis* in Characidae. In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS: Porto Alegre, RS. p.106–169
- Mais C, Wright JE, Prieto JL, Raggett SL, McStay B. (2005) UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes & Development* 19:50–64
- Manchado M, Zuasti E, Cross I, Merlo A, Infante C, Rebordinos L. (2006) Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome* 49: 79–86
- Marques DF, Santos FA, Silva SS, Sampaio I, Rodrigues LRR. (2013) Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology* 11(2):459-466
- Merlo MA, Cross I, Palazón JL, Úbeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L. (2012) Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC Evol Biol* 12:201
- Mirande JM. (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotrop Ichthyol* 8:385–568
- Moore W. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49(1):718-726
- Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Castro RMC. (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11:1–25
- Paintner-Marques TRP, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2002) Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 67:397–402
- Paintner-Marques TG, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2003) Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology*. 26(2):145-149
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti, F. (2013a) Mapping Five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricaridae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisheries* 23:477-489

- Pansonato-Alves JC, Hilsdorf AWS, Utsonomia R, Silva DMZA, Oliveira C, Foresti F. (2013b). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 141:133–142
- Pereira LH, Pazian M F, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. (2011) DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial Dna*, 22(1):87-96
- Pereira L H, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics*, 14(1):1-20
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83: 2934-2938
- Portela ALBS, Galetti Jr PM, Bertollo ALC. (1988) Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* 11(2):307-316
- Portela-Castro ALB, Julio Jr HF, Santos ICM. (2008). Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* 133: 113–118
- Prieto JL, McStay B. (2008) Pseudo-NORs: A novel model for studying nucleoli. *Biochimica et Biophysica Acta* 2116–2123
- Piscor D, Ribacinko-Piscor DB, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP. (2013) Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Molecular Cytogenetics* 6:13
- Rubinoff, D. (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology* 20(4):1026-1033
- Santos AR, Rubert M, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2012) Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas* 149: 24-33
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsonomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F. (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and colocalization in the genome. *Genetica* 141: 329-336
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsonomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F. (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PlosOne* 9 (4). Doi10.1371/journal.pone.0094896
- Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2014). Karyotypic diversity in a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). *Genetics and Molecular Research* 13 (1): 2069-2081.

Schweizer D, Loidl JA. (1987) Model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 9:61–74

Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, Tanee T, Tanomtong A. (2013) Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular Cytogenetics* 6:51

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729

Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JF, Lui RL, Artoni RF, Moreira-Filho O. (2013) Physical mapping of (GATA)*n* and (TTAGGG)*n* sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *Journal of Genetics* 92:1

Togawa, R. C., & Brigido, M. M. (2003) PHPH : Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi* (p. 1). Ribeirão Preto

Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L. (2010) Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)*n* and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138:787–794

Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. (2014) Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. *Cytogenet Genome Res* 142:286–292

Valadkhan S. (2005) snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Chemical Biology* 9:603–608

Vicari MR, Noletto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical inferences*. *Genetics and Molecular Biology* 31 (1):173-179

Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, B PTRS. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360:1847–1857

Wasko AP, Venere PC and Galetti Jr PM. (1996) Chromosome divergences between two sympatric characid fishes of the genus *Bryconamericus*. – *Braz. J. Genet* 19:225 – 230

Wasko AP, Galetti Jr PM. (1998) Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios* 94:185–193

Wasko AP and Galetti Jr PM. (1999) Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae) – *Cytologia* 64: 63 – 67

Tabela 1. 1: Dados citogenéticos em espécies de *Bryconamericus*. 2n = número diploide, NF = número fundamental, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, t. = terminal, pc. = pericentromérico, i.= intersticial, p = braço curto, q = braço longo, RF= Referências.

Espécies	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	NF	AgRONS	DNAr 18S, 28S or 45S	RF
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>exodon</i>	Três Bocas stream/PR	52	16m+12sm+6st+18a	86	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	1
	Três Bocas stream/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	2-5 (t. p ou q m, sm)	8 (t. m, sm)	1
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Água da Floresta river/PR	52	8m+22sm+10st+12a	92	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	2
	Maringá stream/PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	2-4 (t. p sm)	6 (t. p sm)	3
	Keller river/PR	52	8m+28sm+6st+10a	94	2-4 (t. p st)	10 (t. p sm, st)	3
							4
	Tatupeba stream/PR	52	8m+20sm+8st+16a	88	2 (t. p sm)	2 (t. p sm)	3
	Keller river/PR	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	-	4
	Três Bocas stream/PR	52	12m+16sm+10st+14a	90	-	-	5
	Três Bocas stream/PR	52	14m+18sm+10st+10a	94	-	-	5
	Três Bocas stream/PR	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	-	5
	Três Bocas stream/PR	52	10m+14sm+8st+20a	84	-	-	5
	Três Bocas stream/PR	52	12m+10sm+16st+14a	90	2 (t.p st)	2 (t.p st)	6
	Três Bocas stream/PR	52	18m+14sm+10st+10a	94	2-4 (t.p m, q. m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	6
	Três Bocas stream/PR	52	20m+18sm+4st+10a	94	2-5 (t.p m, q m, sm)	2-6 (t.p m, q. m, sm)	6
	Três Bocas stream/PR	52	20m+14sm+12st+6a	98	2-3 (t.p m, q sm, st)	4 (t.p m, q sm, st)	6
	Três Bocas stream/PR	52	22m+18sm+8st+4a	100	3-4 (t.p m, q sm, st)	4-6 (t.p m, q sm, st)	6
	Três Bocas stream/PR	52	18m+24sm+6st+4a	100	3-5 (t.p m, q m,sm)	4-6 (t.p m, q m,sm)	6
	<i>Bryconamericus</i> cf. <i>iheringii</i> Boulenger, 1887	Corumbataí river/SP	52	10 m +14sm+18st+10a	94	2 (t. p a)	2 (t. p a)

<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann, 1908	Mogi-Guaçu river/SP	52	26m/sm+26st/a	78	-	-	7
	Guaçu stream/MS	52	6m+10sm +16st+20a	84	2 (t. p st)	2 (t. p st)	12
<i>Bryconamericus ecai</i> Silva, 2004	Forquetinha river/RS	52	10m+10sm+8st+24a	80	2-4 (t. p m, sm, st, a; q sm)	4 (t. p m, a; q sm)	8
	Forquetinha river/RS	52	10m+14sm+12st+16a	88	2 (t. p st)	2 (t. p st)	8
	Forquetinha river/RS	52	14m+12sm+8st+18a	86	2-3 (t. p sm, a)	6 (t. p m, sm, st, a; q sm)	8
	Forquetinha river/RS	52	10m+24sm+14st+4a	100	2-3 (t. p sm, st)	2 (t. p m, st)	8
	Forquetinha river/RS	52	8m+16sm+14st+14a	90	3 (t. p sm,a)	4 (t. p sm,a; q a)	13
	Forquetinha river/RS	52	10m+16sm+8st+18a	86	2-3 (t. p m,a; q sm)	5-8 (t. p m,a; q sm, st, a)	13
	Forquetinha river/RS	52	8m+18sm+10st+16a	88	2-3 (t. p sm; q st)	8-10 (t. p sm,a; q m,st,a)	13
<i>Bryconamericus turiuba</i> Langeani et al. 2005	Passa Cinco river/SP	52	8 m +10sm +14st +20a	84	2 (t. p st)	4 (t. p st)	12
<i>Bryconamericus</i> sp. A	Piracicaba river/SP	52	6m+30sm+6st+10a	94	2-3 (t. p sm, st)	-	9; 10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. B	Piracicaba river/SP	52	10m+6sm+18st+18a	86	1-3 (t. p sm, st)	-	9
	Piracicaba river/SP	52	6m+10sm+20st+16a	88	1-3 (t. p sm, st)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. C	Três Bocas stream/PR	52	6m+18sm+14st+14a	90	1-4 (t. p m, sm, a; q sm, st)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. D	Avoadeira stream/MT	52	8m+14sm+16st+14a	90	1-4 (t. p st, a)	-	10; 11
<i>Bryconamericus</i> sp. E	Avoadeira stream /MT	54	10m+16sm+22st+6a	102	-	-	10
<i>Bryconamericus</i> sp.	Vermelho river/PR	52	16m+14sm+10st+12a	91	2 (t. p a)	2 (t. p a)	13
	Vermelho river/PR	52	16m+14sm+10st+12a	91	2-3 (t. p m,sm, a; q m)	16 (t. p m,sm, a; q m,st; i. p m)	13
	Cambuta river/PR	52	2m+12sm+20st+20a	88	1-2 (t. p a; q sm)	6 (t. p a; q sm)	13

1- Paintner-Marques et al. (2002); 2- Paintner-Marques et al. (2003); 3- Capistano et al. (2008); 4- Portela-Castro et al. (2008); 5- Eberhardt et al. (2012); 6- Silva et al. (2014); 7- Portela et al. (1988); 8- Santos et al. (2012); 9- Wasko et al. (1996); 10- Wasko and Galetti Jr. (1998); 11- Wasko and Galetti Jr. (1999); 12- Piscor et al. (2013); 13 – Presente estudo.

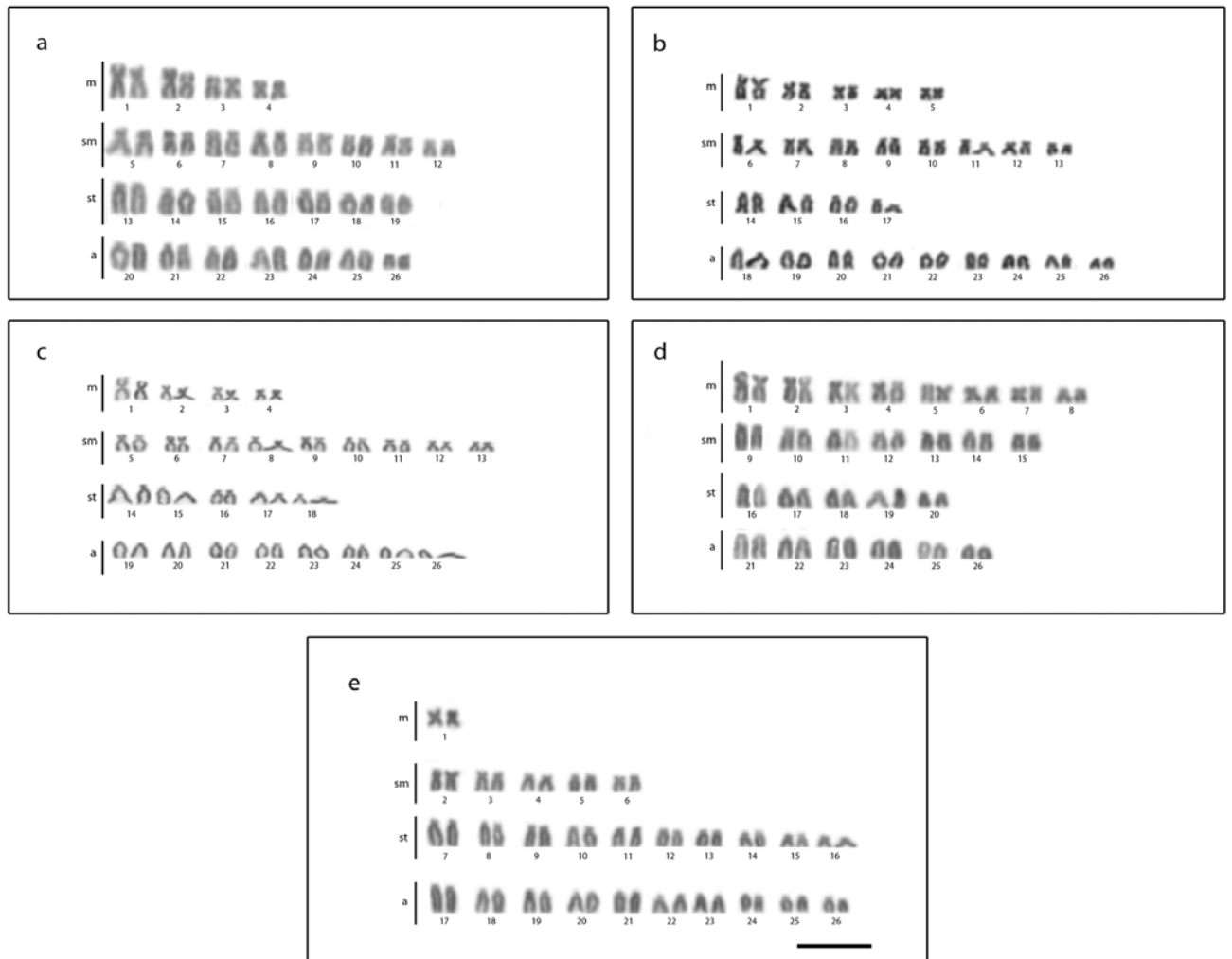


Figura 1. 1: Cariótipo de *Bryconamericus*. a) *Bryconamericus ecai* – citótipo V; b) *B. ecai* – citótipo VI; c) *B. ecai* – citótipo VII; d) cariótipo de *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho; e) cariótipo de *Bryconamericus* sp. rio Cambuta. Barra = 5μm

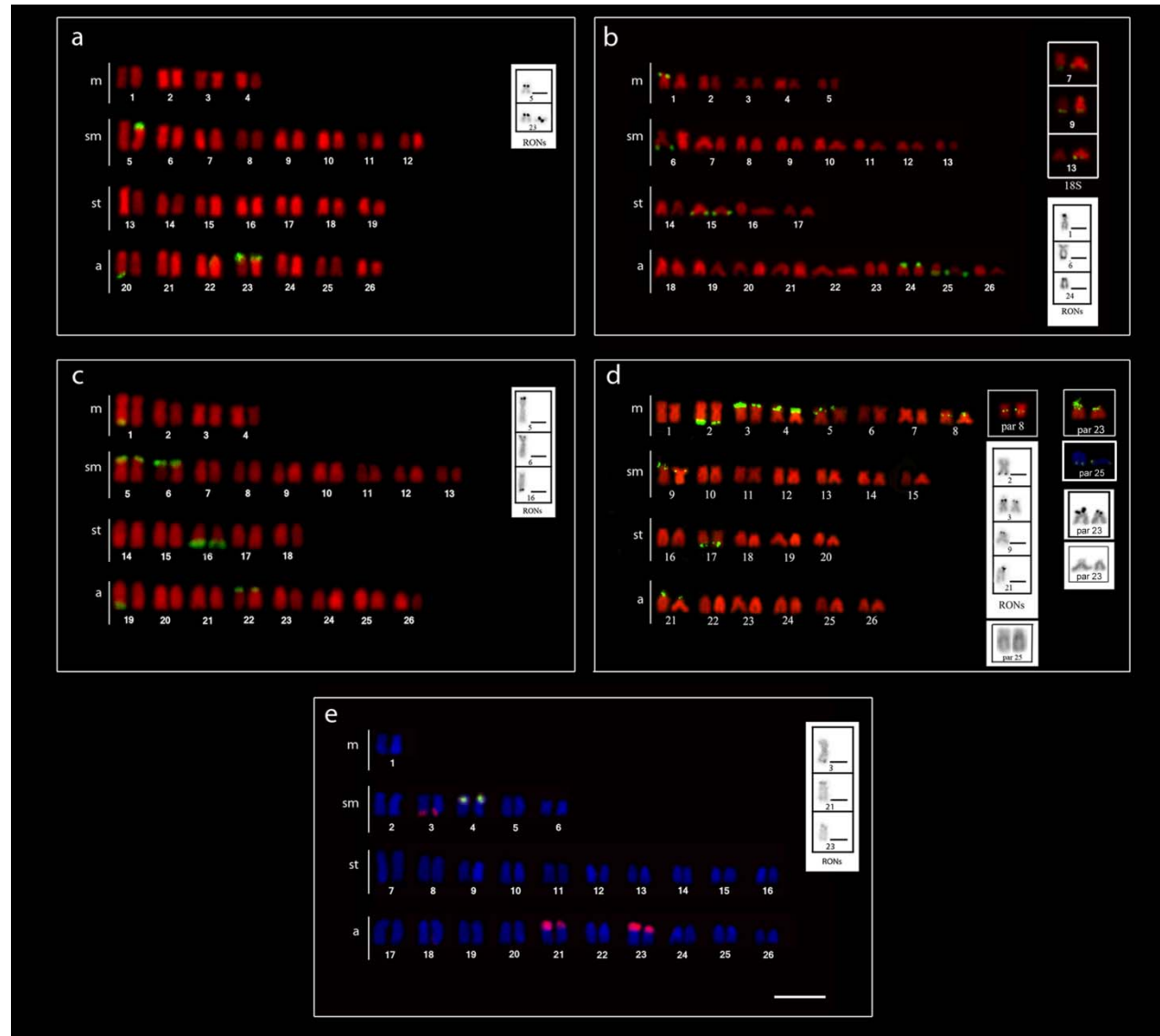


Figura 1. 2: Cariótipos com sítios de DNAr 18S. a) *B. ecai* - citótipo V; b) *B. ecai* - citótipo VI; c) *B. ecai* - citótipo VII; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho grupo 1: o par 24 mostrando heteromorfismo de tamanho; grupo 2: em destaque o par 8 com marcação intersticial; e) Double FISH em *Bryconamericus* sp., rio Cambuta, utilizando sonda de DNAr 18S (vermelho) e de DNAsn U2 (verde). Os boxes mostram diferentes padrões de AgRONs. Em d os boxes com a constrição secundária nos dois grupos. Barra = 5µm.

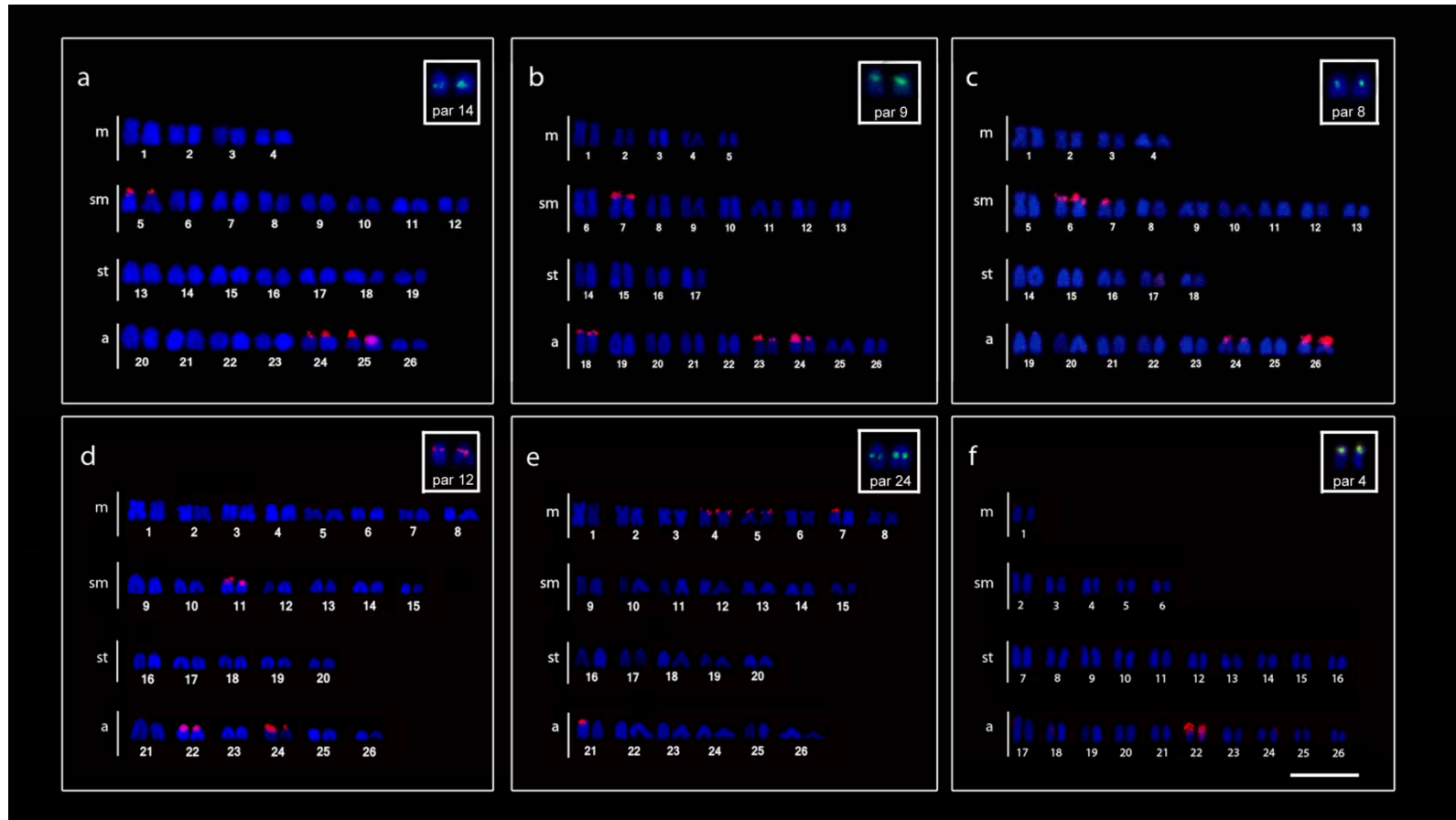


Figura 1. 3: Cariótipos mostrando as diferentes marcações de DNAr 5S: a) *B. ecai* - citótipo V; b) *B. ecai* - citótipo VI; c) *B. ecai* - citótipo VII; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho, grupo 1; e) *Bryconamericus* sp., ribeirão Vermelho, grupo 2; f) *Bryconamericus* sp., rio Cambuta. Nos boxes os pares portadores dos sítios de DNAsn U2.

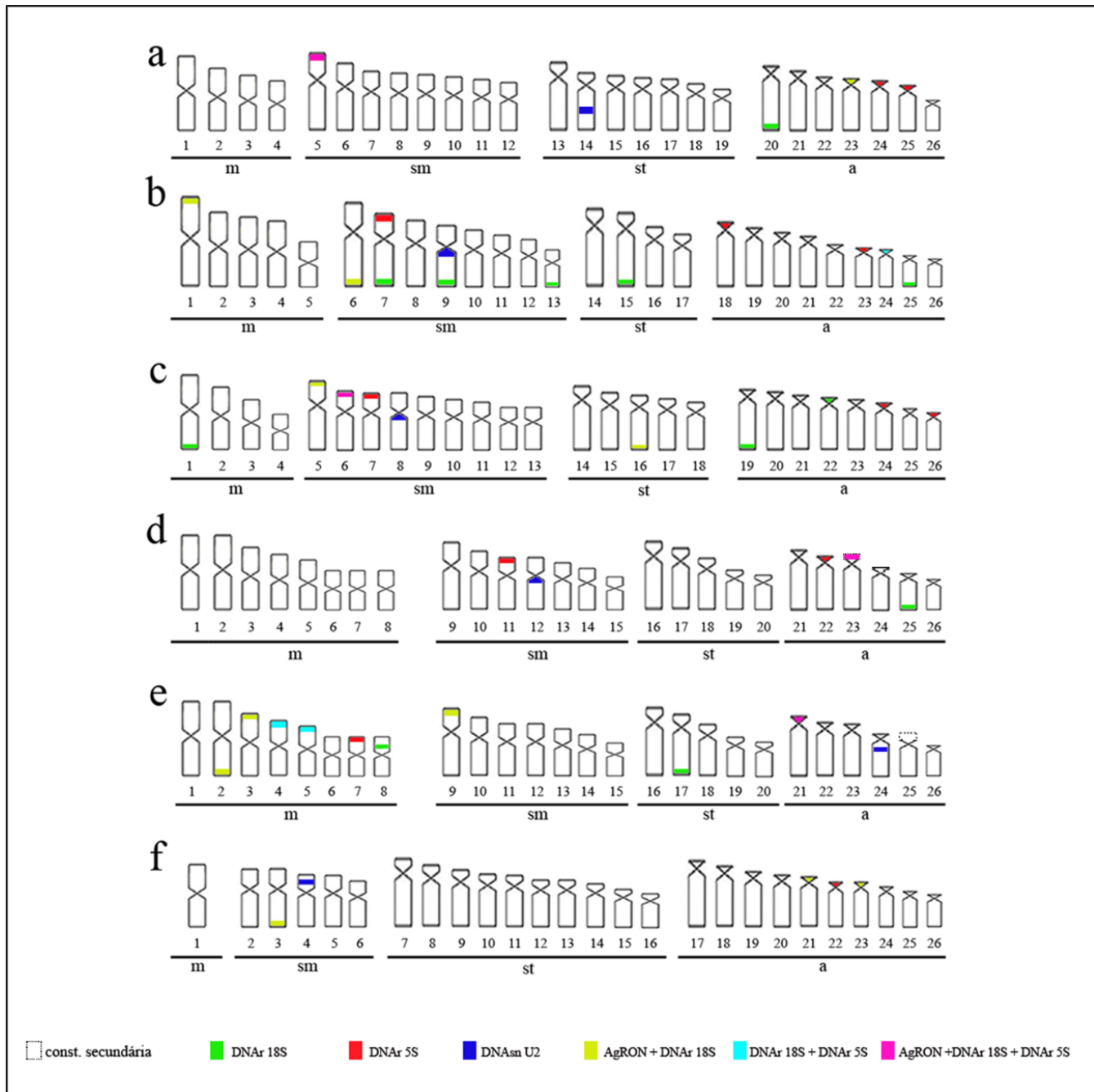


Figura 1. 4: Ideograma representativo das espécies analisadas mostrando os diferentes bandamentos: a) citótipo V; b) citótipo VI; c) citótipo VII de *Bryconamericus ecai*; d) *Bryconamericus* sp ribeirão Vermelho, grupo 1; e) *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho, grupo 2; f) *Bryconamericus* sp. rio Cambuta. m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; st= subtelocêntrico; a= acrocêntrico.

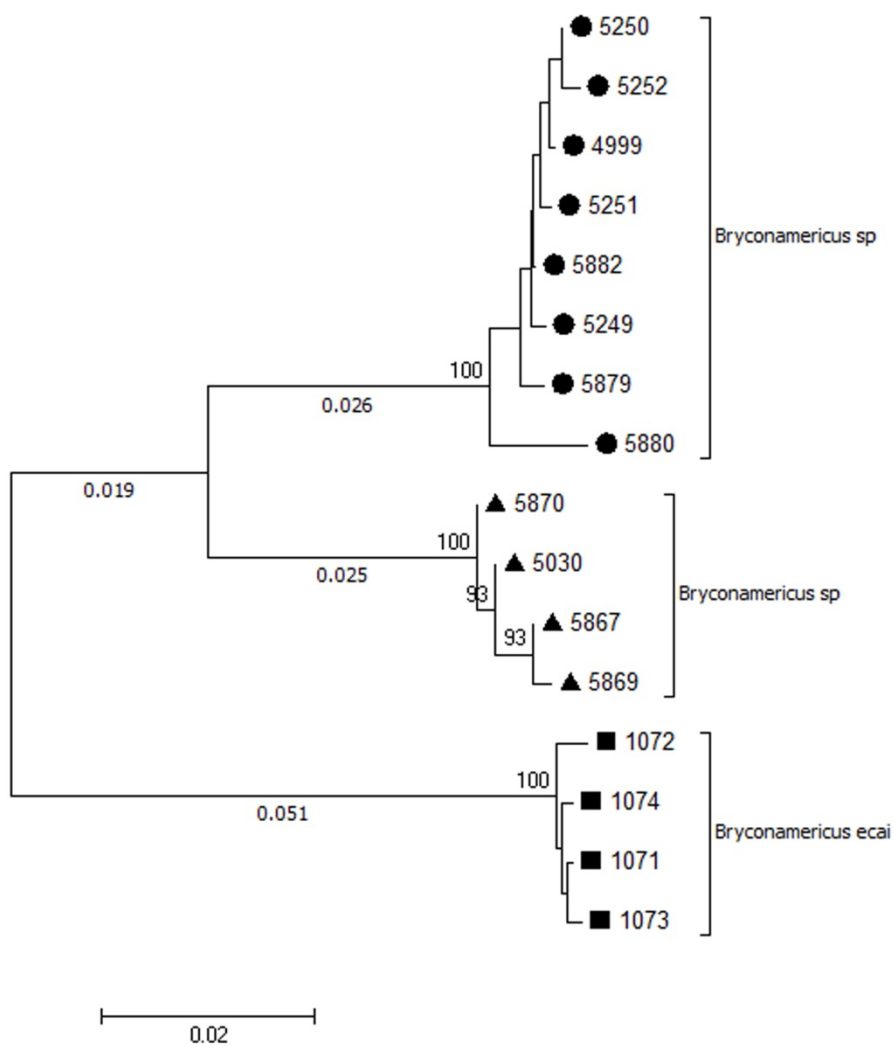


Figura 1. 5: Representação gráfica da distância genética K2P, entre as seqüências CO1 de 16 amostras de *Bryconamericus*. Foi utilizado o método de Neighbor-Joining para o agrupamento da distância genética com 1.000 bootstraps em software MEGA v6.0. Valores de bootstrap dispostos próximos aos nós. Círculos: *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho; triângulos: *Bryconamericus* sp., do rio Cambuta; quadrados: *Bryconamericus ecai*, do rio Forquetinha.

CAPÍTULO 2

Mapeamento cromossômico de DNA ribossomal 5S em diferentes citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): uma análise da distribuição desses genes ribossomais na família Characidae

Este artigo será submetido à publicação à revista **Cytogenetic and Genome Research**.

RESUMO

O DNAr 5S pertence à uma família multigênica, sendo a natureza repetitiva dessas sequências um importante marcador para o mapeamento físico dos cromossomos. Dentre os pequenos caracídeos, *Astyanax* é o gênero que apresenta maior número de estudos com a localização de sítios de DNAr 5S. No presente estudo, foi realizado o mapeamento físico de genes de DNAr 5S em cinco citótipos de *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do ribeirão Três Bocas/PR, dando continuidade às análises citogenéticas convencionais e ao mapeamento de DNAr 18S realizadas anteriormente. Em todos os citótipos foram observados múltiplos sítios de DNAr 5S, variando de 3 a 4 pares de cromossomos, com a maioria das marcações terminais e algumas intersticiais, tanto no braço curto quanto longo dos cromossomos. A análise da distribuição dos genes ribossomais 5S tanto no gênero *Bryconamericus* quanto em Characidae, evidenciou um polimorfismo destes sítios, já característico no grupo para os genes de DNAr 18S e sugere que, possivelmente, a localização terminal da maioria dos sítios de DNAr 5S facilite o processo de distribuição do gene no genoma desses animais, ocasionado por rearranjos cromossômicos.

Palavras-chave: characiformes, citogenética, FISH, pisces, variabilidade cariotípica,

INTRODUÇÃO

O RNA ribossômico é um dos mais abundantes nas células e forma as subunidades maior e menor dos ribossomos, cuja função é a síntese proteica. A subunidade maior do ribossomo é formada pela associação de proteínas ribossomais aos RNAr 28S, 5,8S e 5S e a subunidade menor é formada pelo RNAr 18S e proteínas ribossomais.

Os RNAr 18S, 5,8S e 28S estão relacionados com as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) (Long e David, 1980) e o DNAr que codifica para o gene de RNAr 5S representa a segunda família multigênica. A sequência de nucleotídeos e as posições destas duas famílias multigênicas têm contribuído, nos últimos anos, para compreender a estrutura, organização e evolução dos genomas (Martins et al 2002).

O gene de DNAr 5S consiste em uma sequência codificadora de 120 pares de bases (pb), os quais são separados por espaçadores não-transcritos (NTS), variáveis, o que resulta no dinamismo evolutivo destes genes (Williams e Strobeck, 1985).

A natureza repetitiva dessas sequências caracteriza-as como marcadores úteis para o mapeamento físico dos cromossomos, pois permitem expandir o conhecimento sobre a estrutura e organização do genoma, e detectar possíveis rearranjos envolvidos nesse processo (Silva et al, 2013).

O maior número de estudos relacionados à localização dos sítios de DNAr 5S na família Characidae está relacionado ao gênero *Astyanax*. Pacheco et al (2011), Hashimoto et al (2011) e Domingues et al (2007), estudando diferentes populações de *Astyanax altiparanae*, encontraram apenas um par de cromossomos portadores desses cístrons ribossômicos, localizados na região intersticial. Já em espécies como *Astyanax bockmanni* (Kavalco et al 2009; Hashimoto et al 2011 e Silva et al 2013), *A. paranae* e *A. scabripinnis* (Vicari et al 2008) e *A. fasciatus* (Hashimoto et al 2011; Ferreira-Neto et al 2012) foram

relatados dois pares portadores de DNAr 5S, localizados na região terminal e intersticial dos cromossomos.

Diniz et al. (2009), realizando trabalhos com o gênero *Triportheus*, relataram a presença de apenas um par de cromossomos portadores dos sítios ribossomais 5S em seis das sete espécies estudadas e dez na espécie *T. auritus*. De acordo com esses autores esse padrão pode ser considerado um marcador citogenético para a espécie. Em estudos realizados por Mariguela et al. (2010) e Wasko et al (2001) no gênero *Brycon*, foram observados dois e quatro sítios de DNAr 5S, respectivamente, sendo todos na região intersticial dos cromossomos. Nakayama et al (2008) constataram a presença de apenas um par portador dos sítios de DNAr 5S na região centromérica em três espécies do gênero *Serrasalmus*.

Ainda são poucas as análises de mapeamento cromossômico de DNA ribossômico em espécies do gênero *Bryconamericus*, e a maioria se restringe à localização de DNAr 18S (Paintner-Marques et al, 2003 e 2002; Capistano et al, 2008; Santos et al, 2012; Piscor et al, 2013; Silva et al, 2014). Mapeamento físico de DNAr 5S foi realizado por Piscor et al (2013), que analisaram três espécies de *Bryconamericus*: *B. stramineus* apresentou um par portador do sítio ribossomal com marcação intersticial; *B. turiuba* com dois pares com marcação terminal e *Bryconamericus* cf. *iheringii* um par também com marcação terminal, sendo este sintênico ao sítio de DNAr 18S.

Mais recentemente, Santos et al (submetido para publicação) realizaram estudos cariotípicos em três citótipos de *Bryconamericus ecai*, do rio Forquetinha/RS e em outras duas populações de *Bryconamericus* sp e observaram uma variabilidade de sítios de DNAr 5S, desde seis a oito cromossomos portadores na primeira espécie e de dois a seis cromossomos nas outras duas espécies de *Bryconamericus*.

Com base nos dados acima, o objetivo deste estudo foi realizar um mapeamento cromossômico dos sítios de DNAr 5S em *Bryconamericus* aff. *iheringii*, da bacia do rio Tibagi/PR e, juntamente com relatos da literatura, discutir a distribuição dos genes ribossomais 5S e 18S no gênero *Bryconamericus* e na família Characidae, contribuindo assim para um melhor entendimento do papel destes genes na evolução cariotípica deste grupo de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a hibridação fluorescente *in situ* em 14 indivíduos de *Bryconamericus* aff. *iheringii*, do ribeirão Três Bocas, pertencente à bacia do rio Tibagi, município de Londrina/PR (23°23'06.6''S / 51°04'35.8''W), anteriormente analisados por Silva et al. (2014).

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986). A sonda de DNAr 5S de *Imparfinis schubarti* (Gouveia et al, submetido para publicação), foi marcada por PCR utilizando o nucleotídeo digoxigenina-11-dUTP 1mM (Roche Applied Science). Para a reação de 25µl foram utilizados: 2,5 µl de 10X PCR Buffer; 2 µl de DNA a 20ng/µl; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 2mM cada; primers M13 TOPO (invitrogen) a 10µM; MgCl₂ (50 mM); Taq polimerase a 5U/µl e água para completar a reação. A PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 3 min à 95°C; 33 ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 1min, 95°C por 30s, 51° por 30s, 72° por 1 min, com extensão final de 10min à 72°C em termociclador MJ Research PTC-100.

As sequências foram detectadas com 90 µl de PBS 1x, 10 µl de BSA (5%) e 0,5 µl de antidigoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science), conforme indicação do fabricante e

as lâminas foram contra-coradas com 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI). As imagens foram capturadas com câmera digital Moticam Pro 282B acoplada ao fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B. Para a montagem dos cariótipos, para a identificação da localização dos sítios de DNAr 5S, os cromossomos foram organizados segundo Levan et al. (1964).

RESULTADOS

As análises de DNAr 5S foram realizadas em *Bryconamericus aff. iheringii*, do Ribeirão Três Bocas, que apresentou cinco diferentes citótipos, anteriormente determinados por Silva et al. (2014), todos com número diploide igual a 52: citótipo II: 18m+14sm+10st+10a e NF = 94; citótipo III: 20m+18sm+4st+10a e NF = 94; citótipo IV: 20m+14sm+12st+6a e NF = 98; citótipo V: 22m+18sm+8st+4a e NF = 100 e citótipo VI: 18m+24sm+6st+4a e NF = 100. Os citótipos II, IV, V e VI apresentaram 4 pares de cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S, enquanto no citótipo III foram observados 3 pares de cromossomos com os sítios ribossomais (Figura 2.1).

No citótipo II foram observados o par 3 com marcação terminal no braço longo, e os pares 5, 6 com marcações terminais no braço curto e o par 19 intersticial no braço longo (Figura 2.1a). No Citótipo III foram observadas somente marcações terminais, sendo os pares 2 e 16 no braço curto e o par 14 no braço longo (Figura 2.1b). No citótipo IV foram observados o par 2 com marcação terminal no braço longo, os pares 3 e 5 no braço curto e o par 25 com marcação intersticial no braço longo (Figura 2.1c). No citótipo V foram observadas marcações terminais nos pares 4 e 16 no braço longo, o par 14 no braço curto e o par 25 com marcação intersticial (Figura 2.1d). No Citótipo VI foram observadas somente marcações terminais nos pares 2 e 4 no braço curto e 6 e 22 no braço longo (Figura 2.1e).

DISCUSSÃO

Nas análises citogenéticas realizadas até o momento, em *Bryconamericus aff iheringii*, do ribeirão três Bocas foram encontrados dez citótipos por Eberhardt et al (2012) e Silva et al (2014). O presente estudo mostrou o mapeamento de sítios de DNAr 5S em cinco citótipos dessa mesma espécie, anteriormente encontrados por Silva et al. 2014), dando continuidade aos estudos citogenéticos convencionais e de DNAr 18S. Os resultados corroboram com os dados encontrados por Piscor et al (2013) para a espécie *B. turiuba* e, mais recentemente, por Santos et al (submetido para publicação) em *B. ecai* e em uma espécie de *Bryconamericus* sp. ribeirão Vermelho, onde esses autores também observaram múltiplos cromossomos portadores dos sítios de DNAr 5S.

A presença de um único par portador do sítio foi ainda observada em *Bryconamericus* sp. rio Cambuta, também analisada por Santos et al. (submetido para publicação) e em *B. stramineus* e *Bryconamericus* cf. *iheringii*, estudadas por Piscor et al. (2013). Esses resultados confirmam uma variabilidade no número de sítios de DNAr 5S no gênero (Tabela 1). Interessante notar que, apesar da variabilidade cariotípica em *Bryconamericus* aff. *iheringii*, houve um número conservado de sítios de DNAr 5S em 4 dos 5 citótipos analisados. Foi observada também correspondência entre o par 2 nos citótipos III, IV e VI e no par 3 nos citótipos II e IV (Figura 2.1).

Na família Characidae, o gênero *Astyanax* é o que apresenta maior número de espécies com mapeamento de DNAr 5S, sendo notável um padrão conservado no número destes sítios principalmente em *A. altiparanae*, com 1 par cromossômico em todas as populações analisadas e em *A. fasciatus* com 2 pares, entretanto a localização mostrou-se mais variável ocorrendo em regiões pericentromérica ou intersticial (Tabela 2.1).

Uma maior variabilidade no número de sítios de DNAr 5S em *Astyanax* foi observada na espécie *A. scabripinnis*, onde diferentes populações apresentaram de dois a oito cromossomos portadores deste sítio ribossomal. Entretanto, dentro deste grupo, maior número de sítios foi relatado para as espécies *A. giton* e *A. intermedius*, que apresentaram 10 cromossomos portadores desses sítios (Tabela 2.1). Os dados em *Astyanax* confirmam uma grande variabilidade de sítios de DNAr 5S no gênero, assim como observado em *Bryconamericus*, apesar do menor número de populações estudadas. O mesmo pode ser observado em *Serrapinus*, com apenas duas espécies estudadas, e cada uma com número variável de cromossomos portadores desse DNAr (Tabela 2.1).

Em relação aos demais gêneros da família Characidae, *Brycon*, *Serrasalmus* e *Triportheus* são os gêneros mais conservados, tanto em relação ao número quanto à posição dos sítios de DNAr 5S.

Algumas espécies de caracídeos apresentam sítios de DNAr 5S na região intersticial dos cromossomos (Tabela 2.1) e, segundo Martins e Galetti (1999), essa localização foi considerada, em peixes, como sendo uma condição ancestral para a distribuição desta sequência. Entretanto, nas espécies de *Bryconamericus* analisadas, incluindo as do presente estudo, a maioria dos cístrons está localizada na região terminal dos cromossomos, sugerindo uma condição evolutiva diferente para a localização do DNAr 5S no gênero.

Segundo Nakajima et al (2012), a dispersão de segmentos dos cromossomos por eventos de transposição poderia ser facilitada pela localização de genes na região terminal dos cromossomos.

De acordo com Martins e Wasko (2004), a presença dos sítios de DNAr 5S na região intersticial pode representar uma vantagem relacionada com a organização do gene no genoma dos vertebrados, uma vez que estes estariam protegidos de eventos de rearranjos

cromossômicos. Dessa forma, o gênero *Bryconamericus*, que possui poucos sítios intersticiais, estaria sujeito a sofrer rearranjos, o que estaria levando à variabilidade quanto ao número dos sítios de DNAr 5S neste grupo de peixes.

Apesar de apresentar um número diploide conservado ($2n=52$), é característica do gênero *Bryconamericus* a presença de citótipos devido a uma variabilidade cariotípica tanto intra quanto interpopulacional. Os dados aqui apresentados confirmam a heterogeneidade da família Characidae quanto ao número e localização de sítios de DNAr 5S e evidenciam a natureza polimórfica, já identificada em *Bryconamericus*, com o mapeamento de genes ribossomais 18S. Com isso, os resultados do presente trabalho contribuem para o aumento de dados de mapeamento de genes de DNAr 5S no gênero, bem como auxiliam na compreensão da dinâmica evolutiva do genoma desses peixes, demonstrando que diferentes processos evolutivos estariam atuando sobre o gênero *Bryconamericus* e a família Characidae.

REFERÊNCIAS

Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ: Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research* 97: 229–233 (2002). Doi: 10.1159/000066609.

Castro JP, Moura MO, Moreira-Filho O, Shibatta AO, Santos MH, Nogaroto V, Vicari MR, Almeida MC, Artoni RF: Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Rev Fish Biol Fisheries*. 2014. Doi 10.1007/s11160-014-9377-3.

Capistano TG, Castro ALBP, Julio-Junior HF: Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 203-207 (2008).

Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC: Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 37-41 (2009).

Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Artoni RF: Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*. 5(1): 37-44 (2007).

Fernandes CA, Martins-Santos IC: Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. *Caryologia* 59(3): 253-259 (2006a).

Fernandes CA, Martins-Santos IC: Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29(3): 464-468 (2006b).

Ferreira-Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O: Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genetics and Molecular Biology* 32(4): 792-796 (2009).

Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F: Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *CompCytogen* 6(1): 29-40 (2012). doi: 10.3897.

Ferro DAM, Néo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55-62 (2001).

Gouveia JG, Wolf IR, Moraes-Manécolo VPO, Bardella VB, Ferracin LM, Giuliano-Caetano L, Rosa R, Dias AL: Isolation and characterization of 5S rDNA sequences in catfishes genome (Heptapteridae and Pseudopimelodidae): perspectives for rDNA studies in fish by C0t method. *Cytotechnology*.

Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F: Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 134: 64-71 (2011). doi: 10.1159/000323512

Kantek DLZ, Noleto RB, Maurutto FAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Cestari MM: Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguacxu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. *Journal of Fish Biology* 73: 2012-2020 (2008). doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02030.x

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Parai'ba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet Genome Res* 106: 107-110 (2004). doi: 10.1159/000078567

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica* 124:85–91 (2005). Doi 10.1007/s10709-005-0176-6

Kavalco KF, Almeida-Toledo LF: Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish* 4(2): 103-111 (2007). Doi: 10.1089

Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF: *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica* 136: 135–139 (2009). Doi 10.1007/s10709-008-9325-z

Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF: Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. *Nucleus* 53(1–2): 51–54 (2010). Doi10.1007/s13237-010-0006-9

Kavalco KF, Pazza R, Brandão KO, Garcia C, Almeida-Toledo LF: Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 134: 108–119 (2011). Doi 10.1159/000325539

Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220 (1964).

Long EO, David IB: Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49:727–764. (1980).

Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O: Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetic* 123: 211–216 (2005).

Mariguela TC, Nirchio M, Ron E, Gaviria JI, Foresti F, Oliveira C: Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Comparative Cytogenetics* 4(2): 185-193 (2010). doi: 10.3897/compcytogen.v4i2.49

Martins C, Wasko AP: Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: _____ Focus on Genome Research, Nova Science Publishers, Inc. (2004). p. 335-363.

Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wrightb JM, Foresti F: Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98:78–85 (2002). Doi: 10.1159/000068542

Martins C, Galetti Jr PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363 (1999).

Martins C and Galetti Jr PM: Organization of 5S rDNA in species of the fish Leporinus: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44:903-910 (2001).

Nakayama CM, Feldberg E, Bertollo LAC: Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 868-873 (2008).

Pacheco RB, Rosa R, Giuliano-Caetano L, Júlio Jr HF, Dias AL: Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. *CompCytogen* 5(3): 237–246 (2011). Doi: 10.3897/CompCytogen.v5i3.1235

Pansonato-Alves JC, Hilsdorf AWS, Utsunomia R, Silva DMZA, Oliveira C, Foresti F: Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome *c* oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenet Genome Res* 141:133–142 (2013). Doi: 10.1159/000354885

Paintner-Marques TG, Giuliano-Caetano L, Dias AL: Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas* 137:107-112 (2002).

Paintner-Marques TG, Giuliano-Caetano L, Dias AL: Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* 26(2):145-149 (2003).

Paiz LM, Baumgärtner L, Graça WJ, Margarido VP: Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in Middle Paraná River, Iguassu National Park: considerations on taxonomy and systematics of the genus. *CompCytogen* 9(1): 51–65 (2015). Doi: 10.3897/CompCytogen.v9i1.9002.

Pazza R, Kavalco SAF, Penteadó PR, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF: The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* 72: 2002–2010 (2008). Doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x

Pazian MF, Pereira LHG, Shimabukuru-Dias CK, Oliveira C, Foresti F: Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus *Piabina* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 10(2): 329-340 (2012).

Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 222-226 (2008).

Peres WAM, Buckup PA, Kantek DLZ, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae)

associated with river shed interconnection. *Genetica* 137: 305–311. (2009). Doi 10.1007/s10709-009-9389-4

Peres WAM, Bertollo LAC, Buckup PA, Blanco DR, Kantek DLZ, Moreira-Filho O: Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Rev Fish Biol Fisheries* 22: 519–526 (2012). Doi 10.1007/s11160-011-9246-2

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 2934-2938 (1986).

Piscor, D, Ribacinko-Piscor DB, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP: Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Molecular cytogenetics* 6: 13. (2013).

Santos AR, Rubert M, Giuliano-Caetano L, Dias AL: Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas* 149(1): 24-33 (2012).

Santos AR, Usso MC, Gouveia JG, Araya-Jaime C, Frantine-Silva W, Giuliano-Caetano L, Foresti F, Dias AL: Karyotype organization and mapping of three classes of repetitive DNA sequences in the genus *Bryconamericus* (Characidae): use of DNA barcoding to differentiate among populations. *Rev Fish Biol Fisheries* (Submetido em 2016).

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F: Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and colocalization in the genome. *Genetica* 141: 329-336 (2013).

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano F, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F: Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes) *PlosOne* 9 (4):e94896. Doi10.1371/journal.pone.0094896.

Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias AL: Karyotypic diversity in a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). *Genetics and Molecular Research* 13(1): 2069-2081 (2014).

Silva LLL, Santos AR, Giuliano-Caetano L, Dias AL: Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. *Cytotechnology* 67:1 2015.

Tenório RCCO, Vitorino CA, Souza IL, Oliveira C, Venere PC: Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology* 11(3):553-564 (2013).

Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 173-179 (2008).

Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM: Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902 (2001). Doi 10.1139/gen-44-5-893

Williams SM and Strobeck C: Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. *J Theor Biol* 116:625-636 (1985).

Tabela 2. 1: Dados da localização de DNAr 5S na família Characidae

Gênero e Espécies	Nº de locus de DNAr 5S	Posição	Referência
<i>Astyanax</i>			
<i>A. abramis</i>	4	C	Paiz et al. (2015)
<i>A. altiparanae</i>	2	I	Almeida-Toledo et al. (2002)
<i>A. altiparanae</i>	2	P	Fernandes e Martins Santos (2006a)
<i>A. altiparanae</i>	2	P	Domingues et al. (2007)
<i>A. altiparanae</i>	2	I	Peres et al. (2008)
<i>A. altiparanae</i>	2	prox	Ferreira-Neto et al. (2009)
<i>A. altiparanae</i>	2	P	Hashimoto et al. (2011)
<i>A. altiparanae</i>	2	I	Pacheco et al. (2011)
<i>A. altiparanae</i>	2	I	Kavalco et al. (2011)
<i>A. altiparanae</i>	4	p, i	Tenório et al. (2013)
<i>A. argyrimarginatus</i>	4	p, i	Tenório et al. (2013)
<i>A. asuncionensis</i>	2	c	Paiz et al. (2015)
<i>A. bimaculatus</i> group	2	P	Peres et al. (2012)
<i>A. aff. bimaculatus</i>	2	I	Kavalco et al. (2011)
<i>A. aff. bimaculatus</i>	4	p, i	Tenório et al. (2013)
<i>A. bockmanni</i>	4	d, i	Kavalco et al. (2009)
<i>A. bockmanni</i>	4	P	Hashimoto et al. (2011)
<i>A. bockmanni</i>	4	P	Silva et al. (2013)
<i>A. correntinus</i>	5	C	Paiz et al. (2015)
<i>A. elachylepis</i>	2	P	Tenório et al. (2013)
<i>A. fasciatus</i>	4	I	Almeida-Toledo et al. (2002)
<i>A. fasciatus</i>	4	p, i	Peres et al. (2009)
<i>A. fasciatus</i>	6	p, i	Peres et al. (2009)
<i>A. fasciatus</i>	4	prox	Pazza et al. (2008)
<i>A. fasciatus</i>	4	P	Hashimoto et al. (2011)
<i>A. fasciatus</i>	4	i, d	Ferreira-Neto et al. (2012)
<i>A. fasciatus</i>	4	prox	Ferreira-Neto et al. (2013)
<i>A. fasciatus</i>	4	C	Pansonato-Alves et al. (2013)
<i>A. giton</i>	10	i, t	Kavalco et al. (2004)
<i>A. intermedius</i>	10	i, t	Kavalco et al. (2004)
<i>A. lacustris</i>	2	I	Almeida-Toledo et al. (2002)
<i>A. lacustris</i>	2	I	Peres et al. (2008)
<i>A. mexicanus</i>	6	i, t	Kavalco e Almeida-Toledo (2007)
<i>A. parahybae</i>	4	i, t	Kavalco et al. (2004)
<i>A. paranae</i>	4	prox	Vicari et al. (2008)
<i>A. paranae</i>	4	P	Silva et al. (2014)

<i>A. ribeirae</i>	6	T	Kavalco et al. (2010)
<i>A. schubarti</i>	4	I	Almeida-Toledo et al. (2002)
<i>A. scabripinnis</i>	4	i	Almeida-Toledo et al. (2002)
<i>A. scabripinnis</i>	8	p, t	Ferro et al. (2001)
<i>A. scabripinnis</i>	6	i, t	Kavalco et al. (2004)
<i>A. scabripinnis</i>	4 e 6	p, prox, i	Mantovani et al. (2005)
<i>A. scabripinnis</i>	4	p, subt	Mantovani et al. (2005)
<i>A. scabripinnis</i>	6	p, subt, i	Mantovani et al. (2005)
<i>A. scabripinnis</i>	4	p	Fernandes e Martins Santos (2006b)
<i>A. scabripinnis</i> complex	4	prox, c	Vicari et al. (2008)
<i>A. scabripinnis</i>	2	i	Peres et al. (2008)
<i>A. scabripinnis</i>	3, 6 e 8	prox, i	Castro et al. (2014)
<i>Astyanax sp B</i>	4	p	Kantek et al. (2008)
<i>Astyanax sp C</i>	2	p	Kantek et al. (2008)
<i>Astyanax sp D</i>	2	p	Kantek et al. (2008)
<i>Astyanax sp.</i>	4	c	Paiz et al. (2015)
<i>Astyanax sp</i>	4	p	Tenório et al. (2013)
<i>A. xavante</i>	4	p	Tenório et al. (2013)
Brycon			
<i>B. amazonicus</i>	2	i	Mariguela et al. (2010)
<i>B. brevicauda</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>B. cephalus</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>B. insignis</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>B. lundii</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>B. microleps</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>B. orbignyianus</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
<i>Brycon sp</i>	4	i	Wasko et al. (2001)
Bryconamericus			
<i>B. aff iheringii</i>	6/8	t, p, i	Presente estudo
<i>B. cf. iheringii</i>	2	t	Piscor et al. (2013)
<i>B. ecai</i>	6/8	t	Santos et al. (submetido para publicação)
<i>B. stramineus</i>	2	p	Piscor et al. (2013)
<i>Bryconamericus sp</i>	2/6	t	Santos et al. (submetido para publicação)
<i>B. turiuba</i>	4	p	Piscor et al. (2013)
Serrasalmus			
<i>S. altipinnis</i>	2	c	Nakayama et al. (2008)
<i>S. gouldingi</i>	2	c	Nakayama et al. (2008)
<i>S. serrulatus</i>	2	c	Nakayama et al. (2008)
Triportheus			
<i>T. albus</i>	2	c, tel	Diniz et al. (2009)

<i>T. angulatus</i>	2	c, tel	Diniz et al. (2009)
<i>T. auritus</i>	10	c, tel	Diniz et al. (2009)
<i>T. cf. signatus</i>	2	c, tel	Diniz et al. (2009)
<i>T. guentheri</i>	2	c, tel	Diniz et al. (2009)
<i>T. nematurus</i>	2	c	Diniz et al. (2009)
<i>T. trifurcatus</i>	2	c, tel	Diniz et al. (2009)
<i>Piabina</i>			
<i>P. anhembi</i>	2	t	Pazian et al. (2012)
<i>P. argentea</i>	4/6	t	Pazian et al. (2012)
<i>P. argentea</i>	4	t	Peres et al. (2008)
<i>Orthospinus</i>			
<i>O. franciscensis</i>	4	i, t	Peres et al. (2008)
<i>Serrapinus</i>			
<i>S. heterodon</i>	4	i, t	Peres et al. (2008)
<i>S. piaba</i>	8	i	Peres et al. (2008)
<i>Myleus</i>			
<i>M. micans</i>	2	i	Peres et al. (2008)
<i>Oligosarcus</i>			
<i>O. hepsetus</i>	4	i	Kavalco et al. (2005)

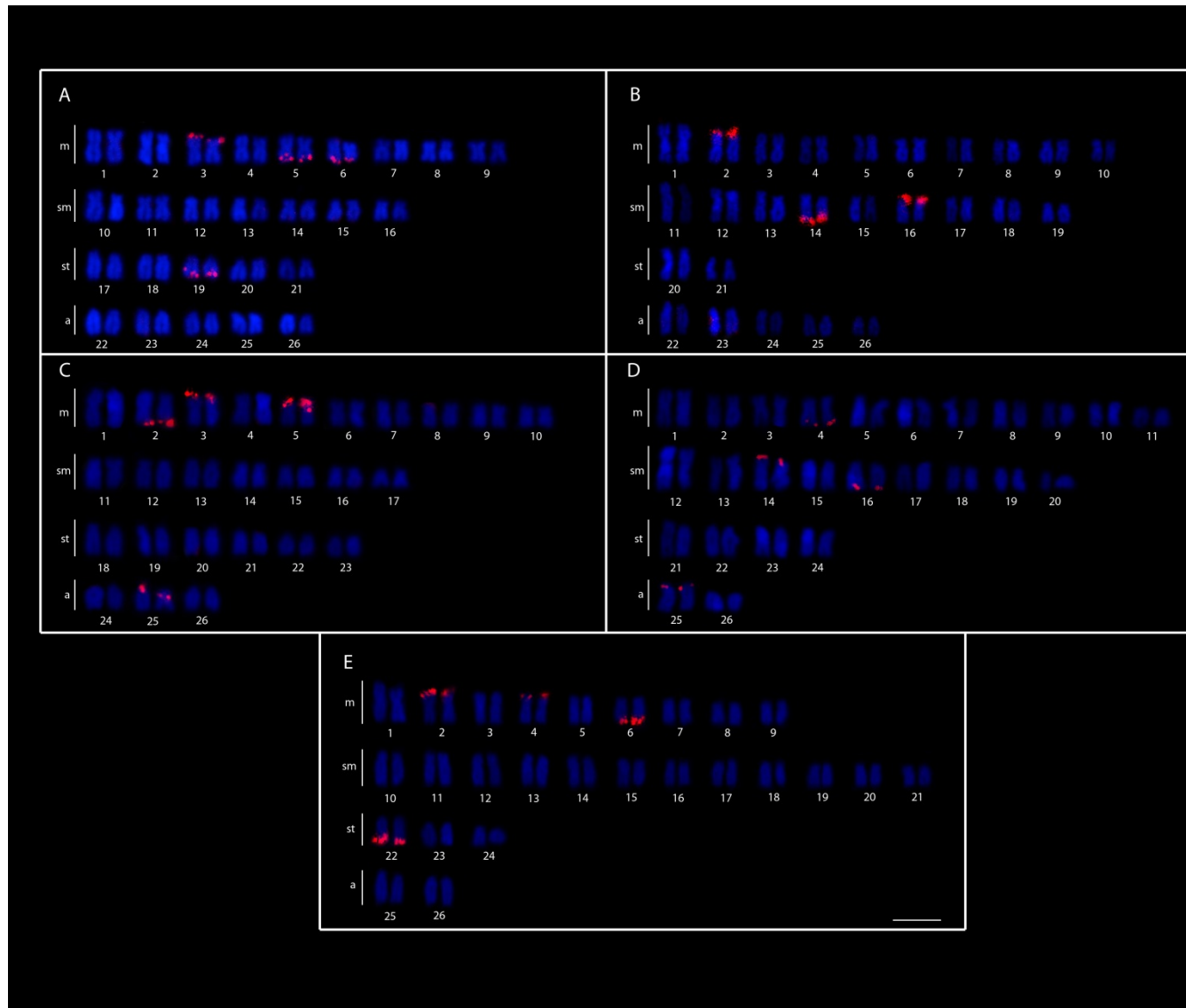


Figura 2. 1: Hibridação fluorescente *in situ*, mapeamento cromossômico de DNAr 5S em *Bryconamericus aff. iheringii* do ribeirão Três Bocas. A) citótipo II; B) citótipo III; C) citótipo IV; D) citótipo V; E) citótipo VI. Barra = 5 μ m

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises citogenéticas nas diferentes populações de *Bryconamericus* do presente estudo, corroboram os dados da literatura confirmando uma variabilidade cariotípica do gênero e evidenciam estudos inéditos para o gênero. Diante disto, destacam-se as seguintes considerações:

1. Os dados cariotípicos confirmam o $2n$ conservado no gênero, com variações na fórmula cariotípica, o que leva à formação de citótipos os quais, provavelmente, são devido à ocorrência de rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações.

2. Em *Bryconamericus ecai*, *Bryconamericus* aff. *iheringii* e *Bryconamericus* sp. do rio Vermelho, foi constatada variabilidade cariotípica intrapopulacional, enquanto a população do rio Cambuta apresentou apenas variabilidade interpopulacional.

3. Com o mapeamento de genes de DNAr foi possível separar a população de *Bryconamericus* sp, do ribeirão Vermelho, em dois grupos, apesar de apresentarem a mesma fórmula cariotípica.

4. Um sistema múltiplo de RONS foi observado para as populações de *Bryconamericus*, confirmado pela FISH com a sonda de DNAr 18S, característica marcante deste grupo de peixes. Entretanto, no grupo 2 de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho, um único par de RONS foi confirmado.

5. A presença de múltiplos sítios de DNAr 5S foi observada em todas as populações de *Bryconamericus* aqui analisadas, contribuindo com mais dados de mapeamento físico deste DNAr para o gênero. A maioria das sequências foi evidenciada na região terminal dos cromossomos, o que pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, ou mesmo a ocorrência de eventos de transposição, que podem estar levando à variabilidade no número de sítios ribossomais nas espécies deste grupo de peixes.

6. Dados inéditos foram obtidos para o gênero, com o mapeamento de sítios de DNAsn U2, evidenciando um único par portador dessa sequência em *Bryconamericus ecai* e nas duas populações de *Bryconamericus* sp, demonstrando que sequências conservadas podem estar presentes no genoma desses peixes, ao contrário da presença de múltiplos sítios de DNAr.

7. A análise molecular da sequência do CO1, realizada pela construção da árvore de Neighbor-Joining, permitiu observar uma diferença genética significativa entre as populações de *Bryconamericus*, formando três diferentes grupos. As populações de *Bryconamericus* sp. do ribeirão Vermelho e do rio Cambuta foram agrupados em dois grupos distintos, e formaram um grupo irmão com indivíduos de *B. ecai*.

8. Os dados aqui apresentados confirmam o polimorfismo característico nesse grupo de peixes e auxiliam na compreensão da dinâmica evolutiva do genoma do gênero, bem como demonstram que processos evolutivos divergentes podem estar atuando sobre as populações de *Bryconamericus*, levando à diferenciação inter e intrapopulacional das espécies.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 97, 229–233. 2002. doi: 10.1159/000066609
- AZEVEDO, C.; PESSANO, E.; TOMASSONI, D.; QUEROL, M.V.; QUEROL, E. Diversidade específica, densidade e biomassa da ictiofauna da nascente do arroio Felizardo bacia do rio Uruguai médio, Uruguaiana, RS, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguaiana (1): 35-45. 2003.
- BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hopliasaimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenet. Gen. Res.**, 132: 71-78. 2011.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília: EMBRAPA. 2ª edição. 2007. 230 p.
- BOORE, J. L. Animal Mitochondrial Genomes. **Nucleic Acids Research**, 27:1, 1767-1780. 1999.
- BUCKUP, P.A.; MENEZES N.A.; GHAZZI M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 2007. 195 p.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res**, 20: 279-292. 2012.
- CARVALHO, D., DENISE, A. A. O., 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**, 22, 80–86. 2011.
- CASTRO, J.P.; MOURA, M.O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O.A.; SANTOS, M.H.; NOGAROTO, V.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Rev Fish Biol Fisheries*. 2014. Doi 10.1007/s11160-014-9377-3.

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

CAPISTANO, T.G.; CASTRO, A.L.B.P.; JULIO-JUNIOR, H.F. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 31:1. 203-207. 2008.

CAZAUX, B.; CATALAN, J.; VEYRUNES, F.; DOUZERY, E.J.P.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC Evolutionary Biology**, 11:124. 2001.

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

DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**. 284: 3-601. 1980.

DOMINGUES, M.S.; VICARI, M.R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J.P.; CESTARI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. 5:1, 37-44. 2007.

DROUIN, G.; MONIZ DE SÁ, M. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Mol. Biol. Evol**, 12, 481-493. 1995.

EBERHARDT, G.N. ; SILVA, L.L.L. ; SANTOS, A.R.; DIAS, A.L. Occurrence of Cytotypes and Variability of AgNORs in a Population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). **Cytologia**, 77, 507-513. 2012.

ESCHMEYER, W.N. **Catalog of fishes**. 2016. Disponível em:
<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in three sympatric cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) from the Ivaí river basin, state of Paraná, Brazil. **Caryologia**. 59:3, 253-259. 2006a.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 29:3, 464-468. 2006b.

FERREIRA IA, POLETTO AB, KOCHER TD, MOTA-VELASCO JC, PENMAN DJ, MARTINS C. (2010) Chromosome Evolution in African Cichlid Fish: Contributions from the Physical Mapping of Repeated DNAs. *Cytogenet Genome Res* 129: 314–322

FERREIRA-NETO, M.; VICARI, M.R.; CAMARGO, E.F.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**. 32:4, 792-796. 2009.

FERREIRA-NETO, M.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P. M.; BAKKALI, M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations **CompCytogen** 6:1, 29–40. 2012. doi: 10.3897

FERRO, D.A.M.; NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**. 110, 55–62. 2001.

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

GÉRY, J. Characoids of the World. T.F.H. Publications, Inc. Ltda, 1977.672p.

GOUVEIA, J.G.; WOLF, I.R.; MORAES-MANÉCOLO, V.P.O.; BARDELLA, V.B.; FERRACIN, L.M.; GIULIANO-CAETANO, L.; ROSA, R.; DIAS, A.L. Isolation and characterization of 5S rDNA sequences in catfishes genome (Heptapteridae and Pseudopimelodidae): perspectives for rDNA studies in fish by C0t method. *Cytotechnology*.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH M.A.; RENS W.; FORESTI F.; PORTO-FORESTI F. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenet Genome Res.**, 134, 64–71. 2011. doi: 10.1159/000323512

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Real Society B**, 270:1, 313-321. 2003a.

- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101:1, 14812-14817. 2003b.
- HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, 2:1, 312. 2004.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.
- JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O. WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet Genome Res**, 110:462–467. 2005.
- KANTEK, D.L.Z.; NOLETO, R.B.; MAURUTTO, F.A.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M.M. Cytotaxonomy of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from the Upper Iguacxu River Basin: confirmation of the occurrence of distinct evolutionary units. **Journal of Fish Biology**, 73, 2012–2020. 2008. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02030.x
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. **Cytogenet Genome Res**, 106, 107–110. 2004. doi: 10.1159/000078567
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. **Genetica**, 124:85–91. 2005. doi 10.1007/s10709-005-0176-6
- KAVALCO, K.F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Molecular Cytogenetics of Blind Mexican Tetra and Comments on the Karyotypic Characteristics of Genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, 4:2, 103-111. 2007. DOI: 10.1089
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: an ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. **Genetica**, 136, 135–139. 2009. doi 10.1007/s10709-008-9325-z
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Molecular cytogenetics of *Astyanax ribeirae* (Teleostei, Characidae), an endemic characin of the Atlantic rainforest. **Nucleus**, 53:1–2, 51–54. 2010. doi10.1007/s13237-010-0006-9

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K.O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Res**, 134, 108–119. 2011. doi 10.1159/000325539

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

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

LIMA, F.C.T. MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R.E; KULLANDER, S.O. & FERRARIS JR, C.J. Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.106-113

LONG, E.O.; DAVID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Annu Rev Biochem**, 49:727–764. 1980.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1,U2 and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, 49: 79-86. 2006.

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

MARIGUELA, T.C.; NIRCHIO, M.; RON, E.; GAVIRIA, J.I.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Comparative Cytogenetics**, 4:2, 185-193. 2010. doi: 10.3897/compcytogen.v4i2.49

MARKMANN, M e TAUTZ, D. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, 360, 1917-1924. 2005.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. Eds: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. 2007. Science Publisher, Inc., USA.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. **Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome**. In: _____ Focus on Genome Research, Nova Science Publishers, Inc. 2004. p. 335-363.

MARTINS, C.; AND GALETTI JR., P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**. 44:903-910. 2001.

MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; WRIGHTB, J.M.; FORESTI F. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenet Genome Res**. 98:78–85. 2002. Doi: 10.1159/000068542

MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; TRALDI, J.B.; SILVA, L.F.; VENERE, P.C.; SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**, 64(1): 121-128. 2011.

MARQUES, D.F.; SANTOS, F.A.; SILVA, S.S.; SAMPAIO, I.; RODRIGUES, L.R.R. Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. **Neotropical Ichthyology**, 11:2, 459-466. 2013.

McNAMARA-SCHROEDER, K.J.; HENNESSEY, R.F.; HARDING, G.A.; JENSEN, R.C.; STUMPH, W.E. The Drosophila U1 and U6 gene proximal sequence elements act as important determinants of the RNA polymerase specificity of small nuclear RNA gene promoters in vitro and in vivo. **J BiolChem**, 276:31786–31792. 2001.

MENEZES, N.A.; WEITZMAN, S.H.; OYAKAWA, O.T.; LIMA, F.C.T., CASTRO, RMC; WEITZMAN, M.J. Peixes de água doce da mata Atlântica. São Paulo: Corprint Gráfica e Editora. 2007. 408p.

MERLO, M.A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. **Genes Genet Syst**, 85:341-349. 2010.

MILANI, E.J.; MELO, J.H.G.; SOUZA, P.A.; FERNANDES, L.A.; FRANÇA, A.B. 2007 Bacia do Paraná B. Geoci. Petrobras, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 265-287.

MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cell. **Expl. Cell Res.**, 101: 235-243. 1976.

MIRANDE, J.C. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, 8:3, 385-568. 2010.

MONAGHAN, M.T.; BALKE, M.; GREGORY, T.R.; VOGLER, A.P.; DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360, 1925-1933. 2005.

MONTOYA-BURGOS, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*. 10.1046/j.1365-294X.2003.01857.x. 2003.

MOYSÉS, C.B.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Estudos citogenéticos em *Bryconamericus* aff. *exodon* (Characidae, tetragonopterinae) do alto Tietê-SP. 41 Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG. **Brazil. J. Genet.**, Supl.,18: 457. 1995.

MOORE, W. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution**, 49:1, 718-726. 1995.

NAKAYAMA, C.M.; FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetics and Molecular Biology**, 31:4, 868-873. 2008.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. **Annu Rev Genet**, 39,121–152. 2005.

OLIVEIRA, C. **Clonagem e caracterização molecular de DNAs repetitivos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e sua localização em cromossomos metafásicos pela aplicação da técnica de hibridação in situ com sondas fluorescentes.** Tese de Livre Docência. UNESP-Botucatu, SP, 208p. 1999.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.S.; ABEI, K.T. MARIGUELA, T.C.; BENINE, R.C.; ORTÍ, G.; VARI, R.P.; CORRÊA E CASTRO, R.M. Phylogenetic relationships within the speciose

family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11:275. 2011.

ORNELAS-GARCÍA, C.P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, 8:340. 2008.

PACHECO, R.B.; ROSA, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; 1, JÚLIO JR., H.F.; DIASA.L. Cytogenetic comparison between two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti et Britski, 2000 (Teleostei, Characidae), with emphasis on the localization of 18S and 5S rDNA. **CompCytogen**, 5:3, 237–246. 2011. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i3.1235

PAIVA, M.P.; ANDRADE-TUBINO, M.F.; GODOY, M.P. **As represas e os peixes nativos do Rio Grande: Bacia do Paraná, Brasil**. Rio de Janeiro: Interciência. 2002

PANSONATO-ALVES, J.C.; SERRANO, E.A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapping Five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricaridae): analysis of chromosomal variability. **Rev Fish Biol Fisheries** 23, 477-489. 2013a.

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 141, 133-142. 2013b.

PAINTNER-MARQUES, T.R.P.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic Diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* Population (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, 67, 397-402. 2002a.

PAINTNER-MARQUES, T.G.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). **Hereditas**, 137, 107-112, 2002b.

PAINTNER-MARQUES, T. G.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**. 26:2, 145-149. 2003.

PAZZA, R.; KAVALCO, S.A.F.; PENTEADO, P.R.; KAVALCO, K.F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) –

a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, 72, 2002–2010. 2008.

doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x,

PESSANO, E.F.C.; AZEVEDO, C.L.O.; QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E.; BRASIL, L.G.; CASTRO, L.R.B.; PINTO, T.B.; CORRÊA, F.V. Ictiofauna do arroio Quarai-Chico, bacia do médio rio Uruguai, no interior do parque Espinilho, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biotemas**. 18(2): 143-153. 2005.

PERES, W.A.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31:1, 222-226. 2008.

PERES, W.A.M.; BUCKUP, P.A.; KANTEK, D.L.Z.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, 137, 305–311. 2009. doi 10.1007/s10709-009-9389-4

PERES, W.A.M.; BERTOLLO, L.A.C.; BUCKUP, P.A.; BLANCO, D.R.; KANTEK, D.L.Z.; MOREIRA-FILHO, O. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). **Rev Fish Biol Fisheries**, 22, 519–526. 2012. doi 10.1007/s11160-011-9246-2

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**, 22:1, 71–79. 2011.

PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, 14:1, 20. 2013.

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

PORTELA, A.L.B.S; GALETTI JR, P.M.; BERTOLLO, A.L.C Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, 11:2, 307-316, 1988.

PORTELA-CASTRO, A.L.B. **Citogenética de peixes da subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): aspectos citotaxonômicos e evolutivos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 76p. 1999.

PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO JR, H.F., SANTOS, I.C.M.; PAVANELLI, C.S. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. **Genetica**, 133, 113-118, 2008. doi: 10.1007/s10709-007-9188-8.

PISCOR, D.; RIBACINKO-PISCOR, D. B.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. **Molecular cytogenetics**. 6, 13. 2013.

RIBEIRO E KÖHLER, A. Ictiofauna do rio Pardinho. **Caderno de Pesquisa. Série Biologia (UNISC)**, vol. 19, no. 2, p. 37-45. 2007.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, 20:4, 1026-1033. 2006.

SANTOS, A.R.; RUBERT, M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**. 149:1, 24-33. 2012.

SANTOS, A.R.; USSO, M.C.; GOUVEIA, J.G.; ARAYA-JAIME, C.; FRANTINE-SILVA, W.; GIULIANO-CAETANO, L.; FORESTI, F.; DIAS, A.L. Karyotype organization and mapping of three classes of repetitive DNA sequences in the genus *Bryconamericus* (Characidae): use of DNA barcoding to differentiate among populations. **Rev Fish Biol Fisheries**. Submetido em 2016.

SILVA, J.F.P. Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes, Characidae) from Southern Brazil. **Neotrop Ichthyol** 2:55–60. 2004.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; DANIEL, S.N.; HASHIMOTO, D.T.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**. 141, 329-336. 2013.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N.; HASHIMOTO, D.T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J.P.M.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Delimiting the origin of a B chromosome by

FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PlosOne* 9 (4):e94896. 2014. Doi10.1371/journal.pone.0094896
 SILVA, L.L.L. ; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic diversity in a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). **Genetics and Molecular Research**. 13:1 2069-2081. 2014.

SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M.B.; CHAVEERACH, A.; KOSYAKOVA, N.; PINTHONG, K.; TANEE, T.; TANOMTONG, A. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Molecular Cytogenetics**, 6:51. 2013.

TAFT, R.J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J.S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. **BioEssays**. 29: 288-299. 2007.

TAUTZ, D.; ACRTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, 18:1, 70–74. 2003.

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

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

TRALDI, J.B.; BLANCO, D.R.; VICARI, M.R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BARROS, A.V.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Genet. Mol. Res.** 12:1, 463-471. 2013.

TOLDO E. E. Jr; ALMEIDA, L. E. S. B. De; CORRÊA, I.C.S.; FERREIRA, E.R.; GRUBER, N.L.S. Wave prediction along Lagoa dos Patos coastline, southern Brazil. **Atlântica**. Rio Grande, 28(2): 87-95. 2006.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by Double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica** 138, 787-794. 2010.

USSO, M.C. **Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de DNAsn U2 em diferentes populações de *Rhamdia quelen*** (Siluriformes, Heptapteridae) 2015. 75fls. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; PANSONATO –ALVES, J.C.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae) Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic and Genome Research** 142, 286-292. 2014.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of pre mRNA splicing. **CurrOpinChemBiol**, 9, 603- 608. 2005.

VICARI, MR; NOLETO,RB; ARTONI, RF; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, LAC. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, 31:1. 173-179. 2008.

WASKO, A.P.; GALETTI JR, P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**, 94, 185–193. 1998.

WASKO, A.P.; GALETTI JR, P.M. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae). **Cytologia**, 64, 63-67. 1999.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALETTI JR, P.M. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, 44, 893-902. 2001. doi 10.1139/gen-44-5-893

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

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, 29:1,188-97, 2007.

WILLIAMS, S.M.; STROBECK, C. Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. **J Theor Biol**. 116:625-636. 1985.