

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

CLEBERSON CEZARIO PRIMO

Estudo cromossômico em espécies de *Rineloricaria* (ACTINOPTERYGII:
SILURIFORMES: LORICARIIDAE): diversidade cariotípica e DNAs repetitivos

Ponta Grossa

2015

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

CLEBERSON CEZARIO PRIMO

Estudo cromossômico em espécies de *Rineloricaria* (ACTINOPTERYGII:
SILURIFORMES: LORICARIIDAE): diversidade cariotípica e DNAs repetitivos

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

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Ponta Grossa

2015

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

Primo, Cleberson Cezario
P952 Estudo cromossômico em espécies de
Rineloricaria (Actinopterygii:
Siluriformes: Loricariidae): diversidade
cariotípica e DNAs repetitivos/ Cleberson
Cezario Primo. Ponta Grossa, 2015.
94f.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Viviane
Nogaroto.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
Vicari.

1.Alterações cromossômicas numéricas.
2.DNAs repetitivos. 3.Elementos
transponíveis. 4.Evolução cariotípica.
5.Rearranjos cromossômicos. I.Nogaroto,
Viviane. II. Vicari, Marcelo Ricardo.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Universidade Estadual do

CDD: 576.312.32



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Cleberston Cezario Primo**.

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dra. Viviane Nogaroto Vicari em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Cleberston Cezario Primo**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dra. Viviane Nogaroto Vicari (Orientadora UEPG), Dr. Daniel Rodrigues Blanco (UTFPR) e Dr^a Michelle Orane Schemberger (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **“Estudo cromossômico em espécies de Rineloricaria (ACTINOPTERYGII: SILURIFORMES: LORICARIIDAE): diversidade cariotípica e DNAs repetitivos”**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de dois mil e quinze.

Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari Viviane Nogaroto Vicari
Prof. Dr. Daniel Rodrigues Blanco Daniel Rodrigues Blanco
Dr^a Michelle Orane Schemberger Michelle Orane Schemberger

Dedico este trabalho aos meus pais
Aparecido e Zenaide, a minha
companheira de todos os momentos
Ellen e a toda minha família.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

(Platão)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado força neste período, e iluminado minha caminhada até este momento.

Agradeço imensamente aos meus Pais, por tudo o que sou como pessoa e como profissional. Sempre estiveram comigo na minha jornada me aconselhando e disponibilizando todo o apoio necessário. Igualmente aos meus irmãos que sempre torceram por mim. A Fernanda por estar me aguentando por tantos anos e me dando apoio durante este período altamente estressante, mas também muito gratificante. Período pelo qual estive ao meu lado nos fins de semana no laboratório, me dando muita alegria e conforto mesmo quando nada parecia dar certo, elevando meu animo e me mantendo firme nesta jornada. Te Amo.

Gostaria também de agradecer a minha orientadora Viviane Nogaroto Vicari, e ao meu co-orientador Marcelo Ricardo Vicari, a quem considero mais do que orientadores, mas parte da minha família, por toda a paciência e cumplicidade que tiveram comigo, estando sempre dispostos a me ajudar e sempre me puxar a orelha, me mantendo no foco do meu trabalho, me cobrando, mas também descontraindo, nos momentos tensos, onde nada parecia dar certo, com toda sua experiência, me tranquilizavam e me faziam repetir até acertar. Muito obrigado.

Agradeço também aos professores Roberto e Mara, que acompanharam desde o início na minha jornada acadêmica, ainda no segundo ano da graduação, acompanhando todo meu desenvolvimento, ou não (rs), tanto na sala de aula quanto no laboratório. Ainda, mais recentemente o professor Mateus que chega ao laboratório com novas experiências, ideias e nova metodologia de trabalho, contribuindo para a ampliação do conhecimento produzido no laboratório.

Agradeço de coração a todos os colegas do mestrado, principalmente ao Lucas e a Viviane, por compartilharem todos os momentos de correria com trabalhos, seminários e provas durante as disciplinas. No laboratório, discutiram execução das técnicas, acompanharam o desenvolvimento do trabalho e compartilharam os projetos para os próximos passos da carreira, com muita apreensão, mas também empolgação. Aos colegas de laboratório, pela amizade, companheirismo, e por todos

os momentos de descontração, festas, compreensão e paciência no dia a dia do trabalho. Agradeço especialmente aos meus grandes amigos e parceiros Leonardo e Thatyla que compartilharam comigo toda a minha trajetória desde a graduação, onde começamos juntos, me ouviram e aconselharam, e ainda me ajudaram a retomar minha trajetória como Biólogo. E ainda por cima tive a imensa felicidade acompanhar a história do casal desde o início e ainda me tornar padrinho de casamento.

Ainda, agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Genética Evolutiva (LabGev) por cederem todo o apoio para a realização desta pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa fornecida. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A família Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes) é extremamente diversificada morfológicamente, conta com um número próximo a 900 espécies válidas, distribuídas em sete subfamílias (Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae). Não obstante, os estudos citogenéticos em representantes da família mostram tendências evolutivas da diversificação cariotípica bem definidas para cada uma das subfamílias, sendo considerado basal o número diploide ($2n$) de 54 cromossomos. Entre os representantes da subfamília Loricariinae a variação do $2n$ é de 36 a 74 cromossomos. Diante destes dados, os rearranjos Robertsonianos são os principais mecanismos para explicar a variação cromossômica numérica na subfamília. *Rineloricaria* é o gênero mais especioso de Loricariinae, com espécies apresentando $2n = 36$ até $2n = 70$ cromossomos. Contudo, pouco se sabe sobre quais os tipos de DNAs repetitivos originam os eventos de fissão e fusão cromossômica. Neste estudo, foram avaliadas espécies de *Rineloricaria* de diferentes rios do sistema hidrográfico do Paraná: *Rineloricaria latirostris* (rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas e rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí); *Rineloricaria pentamaculata* (rio Barra Grande e rio Juruba, bacia do rio Tibagi); e, *Rineloricaria stellata* e *Rineloricaria capitonia* (Alto Rio Uruguai). O objetivo foi de caracterizar cariotipicamente as populações/espécies de *Rineloricaria* estudadas, além de verificar quais os tipos de DNAs repetitivos podem estar relacionados aos eventos Robertsonianos no gênero. Em *R. latirostris* foi detectado $2n = 46$ cromossomos para ambas populações, além de um exemplar triploide para o rio Laranjinha. *Rineloricaria pentamaculata* apresentou $2n = 56$ cromossomos para as populações dos rios Barra Grande e Juruba e um cariomorfo $2n = 54$ cromossomos no rio Barra Grande. *Rineloricaria stellata* apresentou $2n = 54$ cromossomos, enquanto *R. capitonia* detém $2n = 64$ cromossomos, ambas do rio Uruguai. Os resultados com marcadores cromossômicos de rDNA 18S, rDNA 5S e sonda TTAGGGn evidenciaram que estes DNAs repetitivos participaram dos eventos de fusão terminal para terminal (*end to end fusions*) de cromossomos st/a na diversificação cariotípica de *R. latirostris*. Vestígios de sítios teloméricos intersticiais (ITS) foram evidenciados também em *R. pentamaculata*, cariomorfo de 54 cromossomos do rio Barra Grande, sugerindo fusão cromossômica para a diversificação deste cariótipo. A ampla variação de $2n$ entre *R. stellata* e *R. capitonia* é compatível para o isolamento reprodutivo das espécies sintópicas e pode ser explicado por fissões cêntricas na diversificação de *R. capitonia*. Além dos rearranjos Robertsonianos, as inversões pericêntricas também auxiliaram na diversificação de fórmulas cariotípicas entre as espécies/populações. A análise de localização *in situ* do elemento transponível *Tc1-Mariner Like* não mostrou evidências da participação deste transposon nos rearranjos cromossômicos e na dispersão dos sítios múltiplos de rDNA 5S em *Rineloricaria*. Ainda, as análises das sequências *Tc1-Mariner Like* evidenciaram intensa degeneração molecular, principalmente nos domínios transposase. Estes resultados indicam a ausência de atividade destas sequências, as quais devem ser inertes ou servir para outras funções genômicas no gênero. Desta forma, este estudo discute a instabilidade telomérica, DNAs repetitivos e a participação das famílias gênicas de rDNA nos eventos de diversificação cariotípica em *Rineloricaria*.

Palavras chave: alterações cromossômicas numéricas, DNAs repetitivos, elementos transponíveis, evolução cariotípica, rearranjos cromossômicos.

ABSTRACT

The Loricariidae family (Actinopterygii: Siluriformes) is morphologically diverse, has a number close to 900 valid species, distributed in seven subfamilies (Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae and Hypostominae). However, cytogenetic studies in species of the family show evolutionary trends of karyotype diversification well defined for each of the subfamilies and the diploid number ($2n$) of 54 chromosomes is considered basal. Among the representatives of the subfamily Loricariinae, the variation of $2n$ is 36 to 74 chromosomes. Given these data, the Robertsonian rearrangements are the main mechanisms to explain the chromosome number variation in the subfamily. *Rineloricaria* is the most specious genus of Loricariinae, porting species with $2n = 36$ to $2n = 70$ chromosomes. However, little is known about what types of repetitive DNAs originate fission and fusion chromosome events. In this study, species of *Rineloricaria* from different rivers of the Paraná drainage were studied: *Rineloricaria latirostris* (Laranjinha river, Cinzas basin and Barra Grande river, Ivaí basin); *Rineloricaria pentamaculata* (Barra Grande and Juruba rivers, Tibagi basin); and, *Rineloricaria stellata* and *Rineloricaria capitonia* (Upper Uruguai river). The aim of this study was to characterize the karyotypes of populations/species of *Rineloricaria* and to check what types of repetitive DNAs may be related to Robertsonian events in the genus. In *R. latirostris* was detected $2n = 46$ chromosomes for both populations, as well as for a triploid specimen from Laranjinha river. *Rineloricaria pentamaculata* had $2n = 56$ chromosomes to populations from Barra Grande and Juruba rivers and a karyomorph in Barra Grande river with $2n = 54$ chromosomes. *Rineloricaria stellata* had $2n = 54$ chromosomes, while *R. capitonia* presented $2n = 64$ chromosomes, both from the Uruguai river. The results using the chromosomal markers of 18S rDNA, 5S rDNA and TTAGGGn telomeric probe showed that these repetitive DNAs participated in end to end fusions of the st/a chromosomes in the karyotype diversification of *R. latirostris*. Vestiges of interstitial telomeric sites (ITS) were also detected in *R. pentamaculata*, karyomorph of 54 chromosomes from the Barra Grande river, suggesting chromosomal fusion to the diversification of this karyotype. The wide range of $2n$ between *R. stellata* and *R. capitonia* is compatible to the reproductive isolation of syntopic species and the diversification of *R. capitonia* can be explained by centric fusions. In addition to Robertsonian rearrangements, the pericentric inversions also assisted in the diversification of karyotypic formulas among the species/populations. In situ localization analysis using the transposable element *Tc1-Mariner Like* probe showed no evidence of the participation of transposon in chromosomal rearrangements and dispersion of multiple sites of 5S rDNA in *Rineloricaria*. Furthermore, analyzes of the *Tc1-Mariner Like* sequences showed intense molecular degeneration, especially in transposase domains. These results indicate the absence of activity of these sequences, which must be inert or serve to other genomic functions in the genus. Thus, this study discusses the telomeric instability, repetitive DNAs and the participation of rDNA gene families in karyotype diversification events in *Rineloricaria*.

Keywords: numerical chromosomal changes, repetitive DNAs, transposable elements, karyotype evolution, chromosomal rearrangements.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Espécies de *Rineloricaria* estudadas, pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de exemplares analisados. As espécies foram identificadas pelo Dr. Cláudio Henrique Zawadzki e mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA).....45

Tabela 2. Relação de espécies/populações de *Rineloricaria* estudadas quanto ao número diploide, fórmula cariotípica, localização e número de sítios de rDNA, e presença de sítios teloméricos intersticiais.....46

Capítulo II

Tabela 3. Caracterização da sequência nucleotídica do TE *Tc1-Mariner Like* obtido a partir de espécies de *Rineloricaria*, segundo software CENSOR.....63

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Mapa parcial da América do Sul, com destaque para a bacia do rio Paraná, mostrando os pontos de captura das populações de *Rineloricaria*. O número 1 indica o rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas, (*R. latirostris*); no ponto 2 está o rio Juruba, bacia do rio Tibagi (*R. pentamaculata*); no 3 o rio Barra Grande (*R. latirostris* e *R. pentamaculata*, cariomorfos A e B); no 4 o rio Uruguai, bacia do rio Uruguai (*R. stellata* e *R. capitonia*)44

Figura 2. Cariótipos de exemplares de *R. latirostris*. Em (a, b) cariótipo diploide do rio Laranjinha; (c, d) cariótipo triploide do rio Laranjinha; (e, f) cariótipo do rio Barra Grande. Em a, c, e coloração convencional por Giemsa e b, d, f bandamento C, respectivamente.....47

Figura 3. Cariótipos de exemplares de *R. pentamaculata*. Em (a, b) cariomorfo A do rio Barra Grande; (c, d) cariomorfo B do rio Barra Grande; (e, f) cariótipo do rio Juruba. Em a, c, e coloração convencional por Giemsa e b, d, f bandamento C, respectivamente.....48

Figura 4. Cariótipos de *R. stellata* (a, b) e *R. capitonia* (c, d) do rio Uruguai. Em a, c coloração convencional por Giemsa e b, d bandamento C, respectivamente.....49

Figura 5. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda de rDNA 18S. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha; (b) *R. latirostris* triploide do rio Laranjinha; (c) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (d) cariomorfo A de *R. pentamaculata* diploide do Barra Grande; (e) cariomorfo B de *R. pentamaculata* diploide do rio Barra Grande; (f) *R. pentamaculata* do rio Juruba; (g) *R. stellata* do rio Uruguai e; (h) *R. capitonia* do rio Uruguai. As cabeças de setas apontam sítios terminais e as setas sítios centroméricos.....50

Figura 6. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda de rDNA 5S. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha; (b) *R. latirostris* triploide do rio

Laranjinha; (c) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (d) cariomorfo A de *R. pentamaculata* diploide do Barra Grande; (e) cariomorfo B de *R. pentamaculata* diploide do rio Barra Grande; (f) *R. pentamaculata* do rio Juruba; (g) *R. stellata* do rio Uruguai e; (h) *R. capitonia* do rio Uruguai. As cabeças de setas apontam sítios terminais e as setas sítios centroméricos.....51

Figura 7. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda TTAGGGn. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha, (b) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (c) cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande. As setas apontam os vestígios ITS. As cabeças de setas apontam os cromossomos metacêntricos com marcações co-localizadas de sondas TTAGGGn e rDNA 5S apontados nos detalhes das imagens a-b.....52

Capítulo II

Figura 8. Metáfases mitóticas submetidas a FISH mostrando marcações de rDNA 5S, em vermelho, indicadas pelas cabeças de setas; e transposon *Tc-1 Mariner*, em verde, isolado do genoma de *R. latirostris* do rio Laranjinha. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha, (b) *R. latirostris* do rio Barra Grande, (c) *R. pentamaculata* rio Barra Grande (cariomorfo A), (d) *R. pentamaculata* do rio Barra Grande (cariomorfo B), (e) *R. pentamaculata* do rio Juruba, (f) *R. stellata* do rio Uruguai, (g) *R. capitonia* do rio Uruguai. Em (h), (i), (j) e (l), figuras esquemáticas das sequências do *Tc1-Mariner* obtidas de *R. latirostris* (rio Laranjinha), *R. pentamaculata* (rio Juruba), *R. stellata* (rio Uruguai) e *R. capitonia* (rio Uruguai), respectivamente.....64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Bacias Hidrográficas dos rios das Cinzas, Tibagi, Ivaí e Uruguai	3
1.2.1 Bacia do rio das Cinzas	4
1.2.2 Bacia do rio Tibagi	5
1.2.3 Bacia do rio Ivaí	6
1.2.4 Bacia do Rio Uruguai	7
1.3 Os Siluriformes: Aspectos gerais	7
1.4 Aspectos morfológicos e citogenéticos da família Loricariidae	10
1.5 DNAs repetitivos	14
1.6 Elementos Transponíveis em estudos genômicos.....	19
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material Biológico e Locais de Coleta.....	24
3.2 Metodologias.....	25
4. RESULTADOS	28
Capítulo I	29
Capítulo II	53
5. CONCLUSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7. ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Os peixes representam o grupo mais diversificado dentro dos vertebrados (NELSON, 2006), com número superior a 32.000 espécies (ESCHEMEYER; FONG, 2015), o que representa mais da metade dos vertebrados vivos. O Brasil possui uma das maiores redes hidrográficas do mundo, e conseqüentemente, a região Neotropical possui uma fauna de peixes de água doce altamente diversificada (LOWE-MCCONNELL, 1999). Por sua vez, mais de 50% desta ictiofauna é representada por peixes de pequeno porte (até 150 mm de comprimento), geralmente vivos em pequenos riachos, os quais apresentam um alto grau de endemismo (CASTRO, 1999).

A biodiversidade de peixes de riachos contribui significativamente para o alto número de espécies na região Neotropical. Castro (1999) define riacho como parte de um sistema fluvial, com produção primária autotrófica baixa, devido à baixa incidência de luz bloqueada pela vegetação ripária. A comunidade lótica dominante é heterotrófica e depende da importação de material orgânico para subsistir, o que difere de corpos de água maiores, onde há maior incidência luminosa, tornando possível a existência de algas e macrófitas, elevando assim a produção primária, o que diminui a dependência de matéria orgânica externa para a manutenção da comunidade local.

Até 1999, os estudos ecológicos de diversidade de peixes se concentravam em rios de maior porte, sendo que Esteves et al. (1999) alertaram para a escassez de estudos em riachos. Isto se deve ao interesse econômico despertado nestes ambientes maiores, devido ao potencial de utilização para a agricultura, pesca e geração de energia (GALVES et al., 2009), o que levou a considerar que estes

ambientes possuíam maior diversidade, em detrimento aos riachos. No entanto, o aumento no volume de estudos em ambientes de menor volume de água tem demonstrado que a população vivente destes ambientes é composta principalmente de peixes de pequeno porte, e que estes indivíduos apresentam alto grau de endemismo, o que pode resultar em uma maior divergência genética em relação a espécies de grandes rios. Neste sentido, a citogenética tem se mostrado uma ferramenta importante na caracterização ictiofaunística e, associada a outras ferramentas, tais como a sistemática, têm contribuído para a identificação de espécies crípticas (ARTONI et al., 2006, 2009).

Estudos citogenéticos têm se mostrado de grande importância no auxílio da compreensão de acontecimentos genéticos e evolutivos a respeito da diversificação cariotípica dos mais diversos grupos, auxiliando no entendimento a respeito da citotaxonomia de grupos críticos e na compreensão da biogeografia das espécies (ARTONI et al., 2009). Ainda, os peixes apresentam grandes restrições quanto a sua dispersão, sendo que os peixes de água doce, por estarem confinados aos ambientes hidrográficos onde habitam, possuem um estreito relacionamento com a história da dinâmica das bacias hidrográficas (RIBEIRO, 2006). Desta forma, estudos citogenéticos comparativos entre populações ou grupos de espécies de riachos de cabeceiras de rios mostram-se promissores na avaliação da diversidade de peixes e para a compreensão de mecanismos de diferenciação cariotípica (VICARI et al., 2008a, b; ARTONI et al., 2009; CASTRO et al., 2014).

1.2 Bacias Hidrográficas dos rios das Cinzas, Tibagi, Ivaí e Uruguai

A bacia do Rio Paraná é considerada a segunda maior bacia da América do Sul, está localizada entre as coordenadas 15° 25' 47" e 26° 50' 55" de latitude sul e 43° 34' 55" e 55° 55' 53" de longitude oeste e abrange 10% do território nacional com 879.860 km² (AGOSTINHO; JÚLIO, 1999; LOWE-MCCONNELL, 1999). Esta bacia é subdividida em duas grandes regiões, também denominadas de províncias ictiofaunísticas do Alto Rio Paraná e Baixo Rio Paraná (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988).

O sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná inclui toda a drenagem do Rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988). Com a formação da hidrelétrica de Itaipu e consequente inundação do Salto de Sete Quedas (Guaíra-Pr), a barreira geográfica ficou deslocada à barragem da usina (à 150 quilômetros abaixo, em Foz do Iguaçu-PR), permitindo uma notável dispersão de espécies do médio Paraná para os trechos a montante (LOWE-MCCONNELL, 1999). Esta região do Alto Rio Paraná drena uma imensa área ao sul do escudo brasileiro e ao longo do seu curso recebe inúmeros grandes rios: Grande, Iguaçu, Paranaíba, Paranapanema, Tiête, entre outros (LUNDBERG, 1998). Por sua vez, o sistema hidrográfico do Baixo Rio Paraná pertence à região ictiofaunística do Paraná (GÉRY, 1969) que inclui todo o restante da bacia a jusante da represa de Itaipu, como os principais formadores constituídos pelos rios da Plata-Uruguai-Paraná-Paraguai (BRITSKI; LANGEANI, 1988; MENEZES, 1988; WEITZMAN; LANGEANI, 1988; LANGEANI, 1990; MENEZES, 1996; CASTRO; CASSATI, 1997). Entre estas drenagens ocorrem importantes bacias hidrográficas menores, cada uma com um conjunto peculiar de organismos, dentre elas, estão as bacias do rio das

Cinzas, Tibagi e Ivaí, pertencentes ao sistema Alto Rio Paraná, além da Bacia do rio Uruguai, pertencente ao sistema Baixo Rio Paraná.

1.2.1 Bacia do rio das Cinzas

A bacia do rio das Cinzas é um importante afluente da margem esquerda da bacia do rio Paranapanema (sistema do Alto Rio Paraná) e é o principal curso d'água da região do Norte Pioneiro do Paraná (PEREIRA; SCROCCARO, 2013). Nasce na Serra de Furnas a oeste da escarpa devoniana, em Piraí do Sul, e deságua no rio Paranapanema na divisa dos municípios de Santa Mariana e Itambaracá, abrangendo uma área de 9.658 km² (DEBONA et al., 2010). Seus principais afluentes são ribeirão Jaboticabal, ribeirão Vermelho e Laranjinha, principal afluente da margem esquerda (PEREIRA; SCROCCARO, 2013).

O rio das Cinzas após um percurso de 170 km rompe a escarpa da serra da Boa Esperança e depois de 240 km recebe seu principal afluente, o rio Laranjinha, afluindo logo após este encontro, ao rio Paranapanema imediatamente à jusante da UHE Canoas I (VIANNA; NOGUEIRA, 2008). Estudos de levantamento ictiofaunístico realizados na bacia do rio das Cinzas revelaram maior índice de espécies da ordem Characiformes (40 espécies), seguido de Siluriformes (33 espécies), sendo as famílias Characidae (20 espécies), Loricariidae (12 espécies) e Anostomidae (10 espécies) as mais representativas (DEBONA et al., 2010).

1.2.2 Bacia do rio Tibagi

A bacia hidrográfica do rio Tibagi está inserida sobre a Bacia Sedimentar do Paraná, que corresponde a uma depressão deposicional situada na parte centro-oeste do continente sul-americano e conta com uma área aproximada de 25.293 km², o que corresponde a cerca de 13% da área do estado do Paraná (PINESE, 2002). O rio Tibagi possui 550 km de extensão e percorre o primeiro, o segundo e o terceiro planaltos Paranaenses, possui 65 tributários principais e sua nascente está localizada na Serra das Almas entre Ponta Grossa (PR) e Palmeira (PR), a 1.100 metros de altitude (MAACK, 1981). Atravessa o estado em direção norte, até desembocar no reservatório da Usina Hidrelétrica de Capivara, no rio Paranapanema a 298 metros de altitude (PINESE, 2002). O rio Tibagi é o principal afluente do Paranapanema, o qual por sua vez deságua no rio Paraná em seu trecho superior, acima de Sete Quedas, pertencendo à sub-região zoogeográfica do Alto Paraná.

A bacia do rio Tibagi apresenta uma grande diversidade de peixes com maior representatividade em seu trecho final (SHIBATTA et al., 2002). Muitas das espécies tiveram sua abundância reduzida devido as alterações ambientais as quais a bacia vem passando, dentre elas a destruição das florestas ciliares, lançamento de efluentes urbanos não tratados no leito dos rios e aplicação descontrolada de defensivos agrícolas, entre outros. A introdução de espécies tem se mostrado um fator de grande relevância na diminuição da diversidade de peixes local, resultante da falta do domínio da técnica do manejo (SHIBATTA et al., 2002). Todas as espécies registradas para a bacia pertencem à subclasse Actinopterygii e, principalmente, à superordem Ostariophysi (RAIO; BENNEMANN, 2010). Para esta bacia foram descritas 151 espécies, entre estas foram representadas as ordens Characiformes, Siluriformes,

Perciformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (SHIBATTA et al., 2002; SHIBATTA; GEALH; BENNEMANN, 2007; RAIIO; BENNEMANN, 2010).

1.2.3 Bacia do rio Ivaí

A bacia hidrográfica do rio Ivaí (do Tupi, Ivaí = rio das Flechas) pertence ao sistema Alto Rio Paraná e abrange uma área de 35.914 km² (MAACK, 1981). Essas dimensões ocupam cerca de 23% do território paranaense, constituindo a principal bacia hidrográfica do Terceiro Planalto e a segunda maior do estado (MAACK, 1981). O rio Ivaí estende-se por cerca de 685 km, desde suas nascentes, na confluência do rio São João com o rio dos Patos, sendo este o principal curso de origem do rio Ivaí, na divisa entre os municípios de Prudentópolis e Ivaí, no Terceiro Planalto paranaense (MAACK, 1981). A bacia desenvolve-se no sentido geral noroeste, orientando-se para oeste no baixo curso, até sua foz no rio Paraná (MAACK, 1981). O rio Ivaí deságua em um braço do rio Paraná abaixo da foz do rio Paranapanema. Seus principais afluentes são os rios Alonso, Paranaíba e das Antas, pela margem direita e os rios Barra Grande, Corumbataí, Mourão, Ligeiro e dos Índios, pela margem esquerda (MAACK, 1981). Nesta bacia hidrográfica, as principais ordens de peixes representadas são Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (DA GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

1.2.4 Bacia do Rio Uruguai

A bacia do rio Uruguai agrega uma importante região do sistema do Baixo Rio Paraná e abrange uma área de 384.000 km², dos quais 176.000 km² situam-se em território brasileiro. Esta bacia é delimitada ao norte e nordeste pela Serra Geral, ao Sul pela fronteira com a República oriental do Uruguai, a Leste pela depressão central Rio Grandense e a oeste pela Argentina (BRASIL, 2008). O Rio Uruguai nasce da confluência dos rios Canoas e Pelotas, acima do nível do mar, percorrendo um total de 2.262 km até desembocar no estuário da Plata, do qual fazem parte o Rio Paraná e Rio Paraguai, o qual, por fim deságua no Atlântico. No total do seu percurso, o Rio Uruguai pode ser dividido por barreiras físicas em Alto, Médio e Baixo Rio Uruguai (ZANIBONI-FILHO, 2003). O Salto do Yucumã é o marco que divide o Alto e o Médio Uruguai e o Salto Grande é o divisor entre o Médio e o Baixo Uruguai, já na divisa Uruguai/Argentina.

A fauna de peixes do rio Uruguai é similar à do Rio Paraná, porém, foram identificadas apenas 251 espécies com predomínio das ordens Characiformes e Siluriformes, que possuem a maior distribuição nos sistemas fluviais sul-americanos, ocupando os mais diversos ambientes e nichos ecológicos (HAHN; PAVANELLI; OKADA, 2000).

1.3 Os Siluriformes: Aspectos gerais

A ictiofauna da região Neotropical é a mais diversificada do mundo, isto se deve ao histórico geológico e as complexas redes de drenagem existentes nesta região

(RIBEIRO, 2006), sendo que aproximadamente 35% de espécies de peixes conhecidas desta região são representantes da ordem Siluriformes.

Peixes da ordem Siluriformes são caracterizados por possuírem pele coriácea, ou então recoberta por placas ósseas, total ou parcialmente (BRITSKI et al., 1988). Seu comportamento é predominantemente crepuscular ou noturno, alimentando-se principalmente de vermes e insetos, ou como no caso da família Loricariidae, que possuem uma boca em forma de ventosa, sugam detritos do substrato ao qual está preso (BRITSKI et al., 1988; TEUGELS, 1996). A maioria de seus representantes habita as águas doces das regiões tropicais, embora existam algumas famílias que apresentam espécies estuarinas, como Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae (DE PINNA, 1998) e duas famílias apomórficas adaptadas à água salgada, Plotosidae e Ariidae, distribuídas mundialmente (BERRA, 2001). Sua maior diversidade encontra-se na América do Sul, onde são encontradas 14 famílias e aproximadamente 64% das espécies do grupo (MOYLE; CECH, 2000; RODILES-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Siluriformes têm importante papel na biogeografia histórica. Seu padrão de distribuição global demonstra evidências do modelamento geográfico da terra e de sistemas aquáticos. Acredita-se que os Siluriformes foram primariamente habitantes de água doce e que realizaram significantes migrações marinhas (BRIGGS, 2005), sendo esta uma propensão filogenética da ordem, pelo menos de um dos seus ramos principais (BETANCUR-R, 2003). As duas famílias marinhas são, portanto, provavelmente derivadas de ancestrais de água doce e apresentam seu próprio padrão biogeográfico (BERRA, 2001). Sua ampla distribuição e variedade de formas e hábitos os tornam um excelente grupo para estudos ecológicos, evolutivos e filogeográficos (LUNDLBERG; FREIL, 2003).

Quanto à evolução cromossômica, também há grandes dificuldades em se estabelecer um padrão para os Siluriformes, considerando a extensa variabilidade cariotípica predominante tanto em nível de famílias, quanto de gêneros, além da não determinação acurada de seu cariótipo primitivo (LEGRANDE, 1981). Baseado em informações citogenéticas encontradas em Ictaluridae, um cariótipo basal teria número diploide ($2n$) composto de 58 cromossomos e número fundamental (NF) relativamente alto (>80) (LEGRANDE, 1981). No entanto, baseado no número diploide conservado da família Diplomystidae, e considerando esta a mais primitiva dentre os Siluriformes (FINK; FINK, 1981; ARRATIA, 1987; DE PINNA, 1998), Oliveira e Gosztanyi (2000) sugeriram que $2n = 56$ poderia ser o cariótipo ancestral e uma sinapomorfia para algumas espécies desta ordem. Alto valor de NF, característico da ordem Siluriformes (STOLF et al., 2004) e também observado em Characiformes e Gymnotiformes, é proposto por Oliveira e Gosztanyi (2000) como condição plesiomórfica amplamente distribuída neste grupo.

Do total de espécies de Siluriformes já cariotipadas, cerca de 50% possuem número diploide relativamente conservado de $2n = 56 \pm 2$. Oliveira e Gosztanyi (2000) propõem que este conservadorismo, mesmo em um grupo com grande número de espécies e com ampla variedade de tamanho e estrutura populacional, se deve a uma melhor condição para a manutenção celular nestes organismos. Por outro lado, várias famílias como Loricariidae e Callichthiidae apresentam ampla variedade no número cromossômico, sugerindo histórias evolutivas diferentes, com mudanças cromossômicas frequentemente associadas com processo de especiação neste grupo (LEGRANDE, 1981; OLIVEIRA et al., 1988; BRUM; GALETTI Jr., 1997; ARTONI; BERTOLLO, 2001).

1.4 Aspectos morfológicos e citogenéticos da família Loricariidae

A família Loricariidae é a maior família da ordem Siluriformes e é subdividida em sete subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae (ESCHEMEYER; FONG, 2015). Embora as bases de dados atuais considerarem a ocorrência destas sete subfamílias, dentro de Loricariidae a classificação das subfamílias e a relação entre seus gêneros vêm sendo alvo de repetidas reformulações (ISBRUCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006; CHIACHIO et al., 2008; CRAMER et al., 2008; 2011). O traço marcante da morfologia destes peixes é o corpo recoberto por placas dérmicas, motivo pelo qual ganharam a alcunha “cascudos”, além disso possuem a boca em forma de ventosa na região ventral do corpo (SCHAEFER; LAUDER, 1986).

Os dados cariotípicos pertencentes à família Loricariidae revelam uma alta diversidade de números diploides ($2n$) e características cromossômicas, a qual pode variar de $2n = 34$ cromossomos em *Ancistrus* sp. 1 e *Ancistrus* sp. 2 (MARIOTTO et al., 2011; OLIVEIRA, 2006) a $2n = 96$ cromossomos em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2004). Apesar desta ampla variação, tendências da evolução cariotípica são bem definidas dentro de cada uma das subfamílias de Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012). Artoni e Bertollo (2001) propuseram que o número diploide de 54 cromossomos seria um caráter plesiomórfico em Loricariidae, uma vez que é observado em gêneros basais. Ziemniczak et al. (2012) também observaram este $2n$ no grupo irmão Trichomycteridae, o qual pertence à superfamília Loricarioidea. Além disto, este número diploide é observado em alguns representantes

de todas as subfamílias de Loricariidae, sendo mais comum em subfamílias consideradas basais, a exemplo de Neoplecostominae (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Os dados cariotípicos disponíveis para Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos, no entanto com algumas tendências evolutivas bem caracterizadas entre as distintas subfamílias (ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre as espécies pertencentes as subfamílias Ancistrinae e Hypostominae, poucas mantêm o número diploide de 54 cromossomos. Todos os representantes de Ancistrinae possuem $2n \leq 54$, indicando que fusões cêntricas contribuíram para a evolução cariotípica deste grupo (MARIOTTO et al., 2011).

Ancistrinae é composto por 29 gêneros onde se agrupam um total de 256 espécies reconhecidas, sendo quatro destes gêneros representados por espécies monotípicas (FISCH-MULLER, 2003; ESCHEMEYER; FONG, 2015). *Ancistrus* corresponde ao mais diversificado gênero do grupo, apresentando cerca de 62 espécies descritas (BIFI et al., 2009). Análises cariotípicas neste grupo revelaram uma grande diversidade de número cromossômico, desde $2n = 34$ em *Ancistrus* sp. 1, *Ancistrus* sp. 2 e *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (DE OLIVEIRA, 2006; MARIOTTO et al., 2011) até $2n = 54$, em *Ancistrus claro* Knaack, 1999 (MARIOTTO et al., 2011).

Por sua vez, em Hypostominae ocorre uma tendência de aumento de número cromossômico enquanto espécies apresentando 52 ou 54 cromossomos são escassas (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012, 2014). Nesta subfamília, o gênero *Hypostomus*, com cerca de 120 espécies (ZAWADZKI et al., 2010) é o mais numeroso e em relação à citogenética apresenta tendência de aumento do $2n$ a partir dos 54 cromossomos considerados basais (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012). Os estudos citogenéticos em *Hypostomus* indicam grande variabilidade em

diversos aspectos cariotípicos, o que confere ao grupo uma enorme complexidade (ARTONI; BERTOLLO, 1996). As variações cromossômicas inter-populacionais são recorrentes, especialmente em relação à fórmula cariotípica (MICHELLE et al., 1977; ARTONI; BERTOLLO, 1996; ALVES et al., 2006; BUENO et al., 2012).

A subfamília Hypoptopomatinae possui inúmeros questionamentos acerca de suas relações de parentesco e agrupamento de gêneros (CHIACHIO et al., 2008). Entretanto foi considerada um grupo monofilético dentro de Loricariidae, composto por aproximadamente 142 espécies distribuídas em 18 gêneros (CARVALHO et al., 2008; ESCHEMEYER; FONG, 2015). Esta subfamília tende a ser conservativa em relação ao $2n = 54$ cromossomos, a exceções de *Hisonotus gibbosus* ($2n = 58$) e *Otocinclus* aff. *vestitus* Cope, 1872 ($2n = 72$) e com a presença de heteromorfismos de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908) e XX/XY em *Pseudotocinclus tietensis* (Ihering, 1907) (Para uma revisão ver ZIEMNICZAK et al., 2012).

Em Neoplescotominae são descritas 51 espécies (ESCHEMEYER; FONG, 2015) e a citogenética do grupo tem demonstrado um $2n = 54$ cromossomos estável, além de sítios de rDNA 5S e 18S sintênicos, características compartilhadas com o grupo irmão Trichomycteridae e considerados como primitivos para o grupo (ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre as principais variações cariotípicas descritas para esta subfamília estão as alterações de fórmula cariotípica, de número de sítios de rDNA, além de variações em relação aos blocos de heterocromatina (ALVES et al., 2005; ZIEMNICZAK et al., 2012). Por sua vez, as subfamílias Delturinae e Lithogeneinae apresentam poucos e confusos estudos citogenéticos devido as constantes reformulações de subfamílias e gêneros. Estudos citogenéticos em

representantes destas duas subfamílias podem ser importantes para identificação de marcadores cromossômicos primitivos, uma vez que Reis et al. (2006) descreve Delturinae como grupo basal em Loricariidae.

A subfamília Loricariinae, considerada a segunda mais numerosa de Loricariidae, atrás apenas de Ancistrinae, apresenta uma grande diversidade no que diz respeito a número de cromossomos e a fórmula cariotípica (ROSA et al., 2012). *Rineloricaria* Bleeker, 1862 é o gênero mais rico em espécies de Loricariinae, com cerca de 65 espécies (ERRERO-PORTO et al., 2014), das quais cerca de 25% apresentam resultados citogenéticos (ZIEMNICZAK, 2011). Este gênero possui uma ampla variação cariotípica, desde *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) apresentando o $2n = 36$ cromossomos, até *Rineloricaria* sp. e *Rineloricaria* cf. *lima* (Kner, 1853) com um número diploide de 70 cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998; ALVES et al., 2003; RODRIGUES; ALMEIDA-TOLEDO, 2008; ROSA et al., 2012).

Nesta subfamília, Rosa et al. (2012) relataram que tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas, poderiam explicar a variação do $2n$. Giuliano-Caetano (1998) descreveu um amplo polimorfismo numérico para *Rineloricaria latirostris*, com variação do $2n = 48 - 36$ cromossomos oriundos de fusão cêntrica. Rosa et al. (2012) analisaram duas populações da espécie *Rineloricaria* cf. *lima* de afluentes do rio Ribeira, as quais apresentaram uma variação de número cromossômico de 66 a 70 cromossomos, além de diferentes fórmulas cariotípicas, apresentando um total de 8 cariótipos. A variação cromossômica encontrada nesta espécie foi decorrente de rearranjos do tipo fusão cêntrica e inversões, visualizadas com a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) e rDNA

5S em pontos de fusão (ROSA et al., 2012). Da mesma forma, em *Rineloricaria lanceolata* foram encontradas dez formas cariotípicas com variação de $2n = 45 - 48$ cromossomos e $NF = 52 - 55$ (ERRERO-PORTO et al., 2014). Este polimorfismo cromossômico de *R. lanceolata* também foi decorrente de fusões Robertsonianas e diferentes combinações de gametas balanceados (ERRERO-PORTO et al., 2014). Além destas variações de $2n$, em *Rineloricaria pentamaculata* do rio Paraná foram descritos $2n = 56$ cromossomos, contudo com variação intra e interindividual de cromossomos B (ERRERO-PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2010, 2011).

1.5 DNAs repetitivos

Uma das principais características do genoma dos eucariotos é a presença de um grande número de sequências de DNA repetitivo (SUMNER, 2003). Essas sequências são geralmente classificadas em duas diferentes classes, sequências repetitivas em tandem: microssatélites, minissatélites, satélites e famílias multigênicas; e elementos dispersos conhecidos como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH, 1994). DNAs satélites (satDNA), microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas representam classes de DNAs compostos por sequências repetitivas organizadas em tandem que têm se mostrado como fundamentais e promissoras em estudos relacionados à evolução cromossômica (MAXON et al., 1983; HADJIOLOV, 1985; CHARLESWORTH et al., 1994; VICARI et al., 2010).

O estudo de DNAs satélites em peixes neotropicais têm se tornado frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo-específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VICARI et al., 2010), assim como em estudos filogenéticos (KANTEK et al., 2009; PONS et al., 2002; PONS; GILLESPIE, 2003; SCHEMBERGER et al., 2011).

Os genes ribossomais compreendem duas distintas famílias gênicas, compostas por repetições organizadas em tandem. O rDNA maior (rDNA 45S), região responsável pela organização do nucléolo, engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são separados por espaçadores internos e externos e rodeados por espaçadores não-transcritos (LONG; DAWID, 1980). Já o rDNA menor (rDNA 5S) é composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S (LONG; DAWID, 1980). Em função da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos. Inúmeros trabalhos realizados com sondas de rDNA 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios com hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais; contudo, em espécies pertencentes a Loricariidae tais estudos ainda estão em seu início (KAVALCO et al., 2004; 2005; MARIOTTO et al., 2009; 2011; MENDES-NETO et al., 2011; BITENCOURT et al., 2012; ROSA et al., 2012; ZIEMNICZAK et al., 2012; BUENO et al., 2014) frente a enorme diversidade de peixes existente.

Outra classe de sequências repetitivas identificadas como elementos transponíveis (TEs) também tem sido estudada em peixes, especialmente em relação à organização estrutural e mapeamento físico dos cromossomos (DA SILVA et al.,

2002; BOUNEAU et al., 2003; FISCHER et al., 2004; OZOUF-COSTAZ et al., 2004; MAZZUCHELLI; MARTINS, 2009; TEIXEIRA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SCZEPANSKI et al., 2013; SCHEMBERGER et al., 2014). Os TEs podem ser identificados de acordo com sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição. Retrotransposons, conhecidos como elementos transponíveis de classe I, se movimentam no genoma via transcriptase reversa, enquanto os elementos de classe II, identificados como transposons, apresentam sequências que se propagam pelo genoma como fragmentos de DNA (BÖHNE et al., 2008).

Os elementos de classe I ou elementos retrotransponíveis (RTEs) são caracterizados por utilizar mecanismo de transposição via transcrição reversa dos transcritos de RNA em DNA complementar (cDNA), o qual se integra em outros locais do genoma, produzindo assim cópias duplicadas de RTEs (FINNEGAN, 1985; CURCIO; DERBYSHIRE, 2003). Devido à manutenção da cópia no lugar de origem, são considerados um dos agentes responsáveis pelo aumento e diminuição do tamanho do genoma de diversos organismos (FESHOTTE; PRITHMAN, 2007). Esta classe por sua vez pode ser subdividida em retroelementos com longas repetições terminais (LTR, de *long terminal repeats*), e com ausência destas repetições, chamados de não-LTRs.

Os elementos retrotransponíveis LTR possuem as longas repetições terminais arranjadas na mesma orientação e flanqueando a parte central conhecida como ORF (*open reading frame* – fase aberta de leitura). Esta ORF pode ser constituída do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do retroelemento como protease, transcriptase reversa, RNaseH e integrase. Outra ORF é denominada *gag* que codifica uma proteína integrante do capsídeo dos retrovírus. Algumas vezes, uma

ORF para o gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus, pode estar presente (VOLFF et al., 2001; BÖHNE et al., 2008). As três principais superfamílias de retrotransposons LTR descritas em vertebrados são: *Ty1/copia*, *Ty3/gypsy* e família *BEL* (EICKBUSH; MALIK, 2002).

Os retroelementos não-LTRs podem ser divididos em: elementos possuidores de enzimas necessárias à transcrição reversa, representados pelos elementos interespaçados nucleares longos (LINEs, de *long interspersed nuclear elements*) e os não possuidores de enzimas necessárias a sua retrotransposição, representados pelos elementos nucleares interspaçados curtos (SINE, de *short interspersed nuclear elements*). Estes são capazes de utilizar as enzimas produzidas pelos LINEs para realizar sua retrotransposição (SMIT, 2002).

Já os elementos da classe II (transposons) estão subdivididos em elementos transponíveis subclasse I, também conhecidos como TEs corta e cola (*cut and paste*); e subclasse II, representados pelos TEs copia e cola (*copy and paste*) (WICKER et al., 2007). A subclasse I dos TEs é representada principalmente pela superfamília TIR (*terminal inverted repeats*) (WICKER et al., 2007), a qual é caracterizada pela presença das repetições invertidas terminais (TIR) que flanqueiam o gene codificante para a enzima transposase, que permite o movimento direto de uma molécula de DNA de um local a outro do genoma (CHARLESWORTH, 1994). Estes elementos aumentam seu número pela transposição durante a replicação cromossômica de uma posição que já tenha sido replicada a outra região onde ainda não tenha ocorrido este processo, alternativamente eles podem criar uma cópia extra no sítio doador durante o processo de reparo (WIKER et al., 2007). Na subclasse II, estão presentes as superfamílias Helitron (que se replica pelo mecanismo *rolling-circle*, cortando somente

uma fita de DNA); e a superfamília Maverick que se move provavelmente por um mecanismo via excisão de uma fita de DNA seguido de uma replicação extracromossômica e integração a um novo local (WICKER et al., 2007).

Alguns transposons perderam a sequência codificante para a transposase ou possuem esta enzima truncada, sendo denominados TEs não-autônomos (SUMNER, 2003). Estes TEs não autônomos necessitam das enzimas produzidas pelos autônomos (que possuem toda a maquinaria enzimática necessária para sua mobilidade) para se transpor. Sob esse aspecto é importante destacar os elementos transponíveis miniatura (MITEs – *miniature transposable elements*) que são elementos transponíveis de Classe II curtos (100-600 pb), não autônomos e compostos por sequências repetidas invertidas, os quais podem surgir por mutação e consequente degeneração de elementos TEs autônomos (WICKER et al., 2007).

Dentro dos elementos da Classe II que apresentam TIRs está presente a superfamília *Tc1-Mariner*, que se destaca por ter a maior distribuição na natureza. Esses elementos possuem entre 1000 - 5000 pb (pares de bases), são caracterizados por apresentar uma estrutura simples com duas TIRs e uma ORF, a qual codifica a transposase. Os TEs desta superfamília têm preferência por regiões ricas em TA, gerando um sítio de duplicação TA durante sua movimentação do tipo 'corta e cola' (HURST; WERREN, 2001). Esses elementos podem se transpor usando somente a sua transposase, não necessitando assim, de fatores específicos de seu hospedeiro. Outra característica do elemento *Mariner* é a possibilidade de transferência horizontal entre espécies próximas ou distantemente relacionadas (OLIVEIRA et al., 2012).

1.6 Elementos Transponíveis em estudos genômicos

Sequências repetitivas representam importantes componentes do genoma eucariótico, compreendendo de 20 a 50% do conteúdo de DNA celular (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). A variação relacionada ao tamanho de diferentes genomas é frequentemente associada ao acúmulo destas sequências (CAVALIER-SMITH, 1985). Durante muito tempo, sequências repetitivas foram consideradas DNA lixo (DNA *junk*), DNA egoísta (DNA *selfish*) ou DNA parasítico (DNA *parasitic*) (DOOLITTLE; SAPIENZA, 1980; ORGEL; CRICK, 1980; NOWAK, 1994), devido à ausência de funcionalidade no genoma. Com o crescente volume de informações, tais sequências tiveram seu papel ampliado na evolução estrutural e funcional do genoma (para revisão SHAPIRO; VON STERNBERG, 2005; BIÉMONT; VIEIRA, 2006) e envolvimento em rearranjos cromossômicos sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (KIDWELL, 2002).

As cópias de DNA repetitivo *in tandem* estão frequentemente associadas às regiões heterocromáticas, presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos eucarióticos, suportando o papel estrutural destas sequências na evolução genômica (DIMITRI; JUNAKOVIC, 1999). Contudo, os TEs estão dispersos pelos genomas como consequência de seu mecanismo de movimentação e atualmente é sugerido o envolvimento destes TEs nos processos de replicação e recombinação do DNA (BIET et al., 1999; LI et al., 2002) e controle da expressão gênica (LIU et al., 2001). Mesmo em espécies com genomas completamente sequenciados, as sequências repetitivas permanecem como falhas - *gaps* - devido à dificuldade na correta posição e disposição no genoma.

O impacto dos TEs pode adquirir proporções distintas dependendo da localização em que são encontrados. Cópias ativas podem ser observadas principalmente em regiões eucromáticas, enquanto cópias defectivas e rearranjadas em sua maioria, em regiões heterocromáticas (KIDWELL; LISCH, 2001; SCHEMBERGER et al., 2014). A distribuição das cópias de TEs tem mostrado ser não aleatória, com inserções preferenciais em algumas regiões específicas do genoma (KIDWELL; LISCH, 2001). No entanto, não se sabe ao certo se esta localização em determinadas regiões é devido à inserção preferencial ou se é um padrão resultante de diferentes pressões seletivas para estes TEs (KIDWELL, 2002).

Novos TEs podem se originar no genoma por transferência horizontal (OLIVEIRA et al., 2012) ou por eventos de mutação e recombinação de sequências no genoma, levando a uma rápida propagação e aumento do número de cópias destes elementos (FINNEGAN, 1985). Ainda, com sua capacidade de auto-inserção em diferentes locais do genoma, os TEs podem modificar a função de genes a eles associados (KIDWELL, 2002). Esse caráter dinâmico faz com que os TEs tenham uma grande influência na composição e evolução do genoma de animais e plantas.

O ciclo de vida dos TEs envolve o processo de nascimento até a morte destes elementos em um determinado genoma, resultando na sua inativação pelo acúmulo de mutações e, conseqüentemente a perda de identidade. Estudos com elementos repetitivos dispersos em genomas já demonstraram que estes, após a fase de invasão, tendem a sofrer silenciamento epigenético pelo genoma hospedeiro (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007). Seguindo-se a este processo, ocorre a deterioração molecular, com redução crescente da mobilidade do elemento, resultante do acúmulo de cópias defeituosas, até ser incorporado no genoma hospedeiro

(FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012). A deterioração dos elementos dispersos transforma estas cópias em sequências neutras no genoma e, podem servir de matéria bruta para a domesticação pelo genoma hospedeiro (MILLER et al., 1997). O conceito de domesticação ou exaptação molecular foi utilizado para descrever o processo onde uma sequência TE tem uma co-opção para realizar uma função diferente da original para qual ele foi selecionado e trazer benefícios para o genoma hospedeiro (MILLER et al., 1997). De fato, cópias de TEs truncadas podem modular a expressão gênica no genoma hospedeiro por providenciar novos sítios regulatórios, alternativas para sítios de “*splice*”, sinais de poliadenilação, novos sítios de ligação de fatores de transcrição, bem como regulação pós-transcricional e regulação da tradução (MARINO-RAMIREZ et al., 2005; MUOTRI et al., 2007; POLAVARAPU et al., 2008). Em adição, tem sido mostrado que inúmeros genes para microRNAs derivam dos TEs (PIRIYAPONGSA et al., 2007).

Frente à funcionalidade descrita para estes segmentos repetitivos, e considerando a geração de DNA repetitivo como um processo tão antigo quanto à própria história dos eucariotos (JURKA, 1998), faz-se necessário elucidar sua localização, estrutura e função, em diferentes organismos para melhor compreensão da evolução genômica. É conhecido que locais de acúmulo de DNAs repetitivos são pontos quentes de mutação para a ocorrência de rearranjos cromossômicos, e estes poderiam auxiliar a explicar a extensiva variação cariotípica de Loricariidae. Embora as sequências repetitivas dispersas entre os peixes Neotropicais apresentem um crescente no número de descrições, a informação ainda é escassa levando-se em conta o grande número de espécies desse grupo. Não obstante, não é conhecido para

peixes Neotropicais se estes TEs possuem cópias ativas, capazes de realizar cópias de suas moléculas e inserção em outros locais do genoma hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os peixes da família Loricariidae são conhecidos por apresentar ampla diversidade cariotípica, representada por extensivos rearranjos cromossômicos entre espécies diferentes. Os DNAs repetitivos são reconhecidos por constituírem pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos, tais como os que levam as modificações observadas nesta família de peixes. No entanto, poucos estudos buscam caracterizar famílias de DNAs repetitivos em peixes neotropicais, correlacionando estes DNAs repetitivos aos eventos de rearranjos cromossômicos.

Neste contexto, este trabalho tem objetivo de estudar a diferenciação cariotípica em diferentes populações de *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae: Loricariinae), utilizando-se marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos para averiguação dos rearranjos cromossômicos nesse grupo. Os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar cariotipicamente diferentes populações de *Rineloricaria* residentes nos trechos superiores das bacias dos rios das Cinzas, Tibagi, Ivaí e Uruguai;
2. Localizar por hibridação *in situ* fluorescente marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos em tandem;
3. Isolar e caracterizar o elemento transponível *Tc1-Mariner* nos genomas das espécies de *Rineloricaria* estudadas;
4. Correlacionar as regiões cromossômicas portadoras de acúmulo de DNAs repetitivos aos possíveis rearranjos cromossômicos observados na família de peixes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico e Locais de Coleta

Foram analisados citogeneticamente 81 exemplares de diferentes espécies/populações do gênero *Rineloricaria* nas seguintes localidades: 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) de *Rinelocaria latirostris* do rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas (Ventania-PR); 26 exemplares sendo 10 (6 machos e 4 fêmeas) pertencentes à espécie *Rineloricaria latirostris* e 16 (9 machos e 7 fêmeas) de *Rineloricaria pentamaculata* coletados no rio Barra Grande, bacia do rio Ivaí (Prudentópolis-PR); 26 espécimes (11 machos e 15 fêmeas) de *Rineloricaria pentamaculata* do rio Juruba, bacia do rio Tibagi (Apucarana-PR) e; 17 exemplares sendo 16 (8 machos e 8 fêmeas) de *Rineloricaria stellata* e um exemplar (macho) de *Rineloricaria capitonía* coletados no rio Uruguai (São Carlos-SC).

Os peixes foram capturados com auxílio de redes de arrasto, tarrafas, peneiras e transportados vivos para o laboratório de Genética Evolutiva - LabGev da Universidade Estadual de Ponta Grossa. No laboratório, estes animais foram triados e mantidos em aquários para os procedimentos de identificação morfológica e citogenética. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 007/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Anexo 1) e legislação brasileira vigente. A captura e transporte de espécimes de peixes na natureza está de acordo com a licença do Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1; Anexo 2). O Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari foi o coordenador da etapa de coleta de peixes.

3.2 Metodologias

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada segundo as metodologias de cultura curta de células do rim anterior, segundo Fenocchio et al. (1991), com modificações (Anexo 3) e cultivo celular no campo, de acordo com Blanco et al. (2012a) - (Anexo 4). Para a detecção de heterocromatina constitutiva foi aplicada a técnica de bandamento-C, segundo Sumner (1972) - (Anexo 5). A extração do DNA genômico foi realizada com uma porção de fígado (50-100 mg⁻¹cm²), utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) - (MURRAY; THOMPSON, 1980), com modificações (Anexo 6). Para a localização física nos cromossomos foram utilizadas as sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, sequência geral do telômero de vertebrados (TTAGGG)_n e a sonda do elemento transponível *Tc1-Mariner*.

A sonda do rDNA 18S foi isolada a partir do DNA total de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI Jr, 2004), enquanto a sonda do rDNA 5S foi obtida de *Leporinus elongatus* (MARTINS; GALETTI Jr, 1999). A sequência telomérica geral dos vertebrados foi obtida segundo Ijdo et al. (1991) – (Anexo 7). Por sua vez, o elemento transponível *Tc1-Mariner* foi obtido a partir do DNA genômico de cada uma das espécies de *Rinelocaria* deste estudo via amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando-se os seguintes primers: Mariner P Fw: 5' ACCTGTTCAATTGCTTGTTA 3' e Mariner P Rv: 5' ACTGCCTTAATTCTTCGTG 3'; Mariner Takifugu: 5' CACTCACCGGCCACTTTATTA 3'; Mariner 1: 5' CAGGGGTTGGACAATGAAACT 3' (Anexo 8).

Os fragmentos do elemento *Tc1-Mariner* de tamanhos em torno de 1200 pb foram isolados e ligados ao plasmídeo pGEM[®]-t (Promega), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 9). Os produtos das ligações foram transformados em

bactérias *Escherichia coli* DH5- α (Anexo 10). As colônias recombinantes foram sujeitas à minipreparação plasmidial utilizando-se o kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare) – (Anexo 11).

Para a marcação da sonda do rDNA 18S e da sequência geral de telômero de vertebrados foi utilizado o kit *Biotin-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science), de acordo com o manual (Anexo 12). Por sua vez, as sondas do rDNA 5S e do elemento transponível *Tc1-Mariner* foram submetidas à marcação com o kit *DIG-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science), segundo as instruções do fabricante (Anexo 13). Para a marcação das sondas foi utilizado também a PCR marcada, com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (por exemplo, biotina 16 dUTP, Roche Applied Science) – (Anexo 14). Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o procedimento geral descrito por PINKEL et al. (1986) – (Anexo 15).

As melhores metáfases foram fotografadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. As melhores imagens foram então utilizadas para organizar os cariótipos, nos quais os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico (LEVAN et al., 1964), sendo que o limite de relação de braços (RB), braço maior/braço menor obedece ao estabelecido:

RB = 1,00-1,70 - metacêntrico (m)

RB = 1,71-3,00 - submetacêntrico (sm)

RB = maior que 3,01- subtelocêntrico/acrocêntrico (st/a)

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos. Por sua vez, cromossomos classificados como subtelo/acrocêntricos foram considerados com apenas um braço cromossômico

Clones positivos para o TE *Tc1-Mariner* foram submetidos ao serviço de sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares (disponibilizado pela empresa Ludwig Biotec), utilizando-se o equipamento ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Para identificação de possíveis similaridades dos DNAs repetitivos com aquelas já depositadas em banco de dados, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à análise em base de dados de DNAs repetitivos de referência para sequências repetitivas e TEs utilizando: CENSOR *online software* (JURKA et al., 2005), *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>) para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados; software Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009) e banco de dados Pfam (FINN et al., 2010) para identificação de domínios proteicos.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

1. Diversificação cariotípica em espécies de *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)
2. Análise citogenética e molecular do elemento transponível *Tc1-Mariner Like* em espécies de *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)

Capítulo I

Diversificação cariotípica em espécies de *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)

Resumo

Loricariinae é uma subfamília de Loricariidae altamente diversificada quanto a organização cariotípica de seus representantes. Nesta, estudos citogenéticos com peixes do gênero *Rineloricaria* já demonstraram ampla variação do número diploide ($2n$), decorrentes de rearranjos Robertsonianos. Aliados aos eventos de fusão/fissão para alteração do $2n$, as inversões contribuem com a diversificação de fórmulas cromossômicas no grupo. Desta forma, neste estudo foram avaliadas citogeneticamente diferentes populações/espécies do gênero *Rineloricaria* com objetivo de descrever a organização cariotípica dos representantes e entender os mecanismos que levaram a extensiva variação de números cromossômicos. Os resultados encontrados evidenciaram populações/espécies com $2n = 46$ cromossomos em *R. latirostris*, além de um exemplar triploide. Em *R. pentamaculata* foram encontrados dois cariomorfos (cariomorfo A com $2n = 56$ cromossomos e cariomorfo B com $2n = 54$ cromossomos) sem evidências de formação de híbridos. Para as espécies simpátricas *R. stellata* e *R. capitonia* foi observado $2n = 54$ e $2n = 64$ cromossomos, respectivamente. Com o uso de marcadores cromossômicos de rDNAs e sonda TTAGGGn por hibridação *in situ* fluorescente foi possível detectar sítios de rDNA 18S, rDNA 5S e TTAGGGn em regiões centroméricas de cromossomos metacêntricos, os quais participaram dos eventos de fusão. Em espécies com $2n$ altos é provável a ocorrência de fissões cêntricas na diversificação cariotípica. Neste estudo, são realizadas inferências sobre a instabilidade telomérica, quebras e

rearranjos decorrentes de sítios teloméricos intersticiais, além da provável atuação dos rDNAs em fusões cromossômicas atuantes na diversificação cariotípica do grupo.

Palavras-chave: FISH; fissão/fusão cromossômica; rDNAs; sítios ITS.

Introdução

Peixes da ordem Siluriformes são os mais diversos e estão amplamente distribuídos dentro do grupo Ostariophysi (TEUGELS, 1996). Possuem 39 famílias reconhecidas e cerca de 3600 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2015). A família Loricariidae é a mais numerosa da ordem Siluriformes, sendo subdividida em sete subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae (ESCHMEYER; FONG, 2015). Dados citogenéticos na família Loricariidae revelam extensiva variação cromossômica no grupo, decorrente da ampla variação de números diploides ($2n = 34 - 96$ cromossomos) e inúmeros tipos de rearranjos cromossômicos geradores da diversidade cariotípica (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2003; KAVALCO et al., 2005; BLANCO et al., 2012; 2013; BUENO et al., 2012, 2014).

Em Loricariidae, o $2n$ de 54 cromossomos foi considerado característica plesiomórfica (ARTONI; BERTOLLO, 2001), uma vez que é observado em gêneros considerados basais e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012). Loricariinae, segunda mais numerosa subfamília de Loricariidae, possui a maior parte de suas espécies com características altamente diferenciadas em relação às características primitivas do grupo, a exemplo da variação de $2n = 36$ até 70 cromossomos no gênero *Rineloricaria* (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014) e a presença de cromossomos B e sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos em *Harttia* (CENTOFANTE et al., 2006; BLANCO et al., 2012b; 2013).

Os principais rearranjos cromossômicos envolvidos na diversificação cariotípica de Loricariinae são os eventos de fusão e fissão cêntrica (ALVES et al.,

2003; KAVALCO et al., 2005; ROSA et al., 2012; BLANCO et al., 2013; ERRERO-PORTO et al., 2014), aliados às inversões (ROSA et al., 2012; TAKAGUI et al., 2014). O gênero *Rineloricaria* constitui um bom exemplo da plasticidade cariotípica observada no grupo, sendo que além da ampla variação do $2n$ entre as espécies, ocorrem ainda polimorfismos numéricos em *R. latirostris* $2n = 36 - 48$ cromossomos; $2n = 66 - 70$ em *R. lima*; e, $2n = 45 - 48$ cromossomos em *R. lanceolata* (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014). Em *R. lima* foram detectados vestígios de sítios teloméricos intersticiais (ITS) e rDNA 5S em cromossomos fusionados, além de diferentes combinações gaméticas para ocorrência de oito organizações cariotípicas diferentes (ROSA et al., 2012). Já em *R. lanceolata* foram encontrados sítios ITS em cromossomos fusionados e dez cariótipos diferentes oriundos das combinações gaméticas dos cromossomos variantes (ERRERO-PORTO et al., 2014).

Na grande maioria dos casos a organização cariotípica das espécies é única, reflexo da história evolutiva do grupo, sendo assim um bom método para discriminar os organismos (GUERRA, 1988). Desta forma, visto que os peixes da família Loricariidae são conhecidos por apresentar ampla diversidade cariotípica, e que os DNAs repetitivos são reconhecidos por constituírem pontos quentes para quebras e rearranjos, este trabalho teve como objetivo analisar a diferenciação cariotípica em diferentes espécies/populações de *Rineloricaria*, utilizando-se a análise citogenética convencional, marcadores cromossômicos de DNAs ribossomais e sequência telomérica como ferramenta para entender os possíveis rearranjos cromossômicos nesse grupo.

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente 81 exemplares de diferentes espécies/populações do gênero *Rineloricaria* capturados em diferentes bacias hidrográficas do sistema rio Paraná: *R. latirostris*, rio Laranjinha; *R. latirostris* e *R. pentamaculata*, rio Barra Grande; *R. pentamaculata*, rio Juruba; e, *R. stellata* e *R. capitonia* do rio Uruguai. A Figura 1 representa um mapa mostrando os locais de coleta (Figura 1). Os dados referentes a amostragem estão sumarizados na Tabela 1. A captura e transporte de espécimes de peixes na natureza está de acordo com a licença do Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1).

Os procedimentos de manipulação animal em pesquisa estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 007/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira vigente. Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo as metodologias descritas por Fenocchio et al. (1991) e Blanco et al. (2012a). A detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada segundo o bandamento *Barium Sodium Giemsa* (BSG), descrito por Sumner (1972).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi desenvolvida conforme Pinkel et al. (1986), utilizando-se as sondas de rDNA 18S (HATANAKA; GALETTI Jr., 2004), rDNA 5S (MARTINS; GALETTI Jr., 1999) e sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n obtida segundo Ijdo et al. (1991). Para a amplificação da sequência telomérica foram utilizadas duas condições de amplificação, a primeira é realizada com baixa estrigência: 4 min a 94 °C; 12 ciclos de (1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min e 30 s a 72 °C), seguidos por 35 ciclos de alta estrigência (1 min a 94 °C, 1 min e 30 s a 60 °C e 1 min e 30 s a 72 °C). As sondas do rDNA 18S e sequência telomérica

foram marcadas com biotina 16 dUTP utilizando o *kit Biotin-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science), enquanto a sonda do rDNA 5S foi submetida à marcação com digoxigenina 11 dUTP com o *kit DIG-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science), segundo as instruções do fabricante. Todas as misturas de hibridação tiveram uma estringência aproximada de 77% (1 µg de cada sonda, 50 % formamida deionizada, 10 % sulfato dextrano, 2 x SSC, 37 °C por 16 h). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®).

Para a montagem dos cariótipos os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos de metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtlocêntrico/acrocêntrico (st/a) classificados de acordo com a razão de braços, descrito por Levan et al. (1964). Para o estabelecimento do NF foram considerados os cromossomos st/a como um único braço cromossômico, como previamente convencionado para Loricariidae. Para a definição do número de marcações na FISH foram considerados aqueles sinais de rDNA ou sequência telomérica com alta repetitividade em cerca de 30 metáfases analisadas.

Resultados

Coloração convencional por Giemsa e bandamento C

Foram obtidos resultados citogenéticos para quatro espécies identificadas morfológicamente. Para as populações de *R. latirostris* coletadas no rio Laranjinha (bacia do rio das Cinzas) e rio Barra Grande (bacia do rio Ivaí) foi observado o $2n = 46$ cromossomos subdivididos em $10m+4sm+32st/a$ e $NF = 60$ (Tabela 2, Figura 2a, e). Esta espécie apresentou também um exemplar triploide $2n = 3x = 69$ cromossomos, $15m+6sm+48st/a$ e $NF = 90$ para a população do rio Laranjinha (Tabela 2, Figura 2c). O bandamento C evidenciou pequenos blocos na região pericentromérica de todos cromossomos para ambas as populações, à exceção do par $m 2$ dos exemplares do rio Laranjinha, onde o bloco foi maior (Figura 2).

No rio Barra Grande, coletados em simpatria e sintopia à espécie *R. latirostris*, foram capturados dois cariomorfos para a espécie *R. pentamaculata*. O denominado cariomorfo A de *R. pentamaculata* apresentou $2n = 56$ cromossomos, fórmula cariotípica de $4m+10sm+42st/a$ e $NF = 70$ (Tabela 2, Figura 3a). O bandamento C neste cariomorfo evidenciou pequenos blocos pericentroméricos nos cromossomos, além de todo o braço curto do braço $sm 3$ marcado (Figura 3b). O cariomorfo B de *R. pentamaculata* apresentou $2n = 54$ cromossomos subdivididos em $6m+4sm+44st/a$ e $NF = 64$ (Tabela 2, Figura 3c). O bandamento C do cariomorfo B de *R. pentamaculata* apresentou blocos evidentes de heterocromatina na região centromérica dos cromossomos além de todo o braço curto do braço $sm 3$ marcado (Figura 3d). *Rineloricaria pentamaculata* do rio Juruba (bacia do rio Tibagi) apresentou $2n = 56$ cromossomos, fórmula cariotípica de $4m+10sm+42st/a$ e $NF = 70$ (Tabela 2, Figura

3e). O bandamento C neste cariomorfo evidenciou pequenos blocos pericentroméricos nos cromossomos além de todo o braço curto do braço sm 3 marcado (Figura 3f).

A espécie *R. stellata* do rio Uruguai apresentou $2n = 54$ cromossomos subdivididos em $6m+14sm+34st/a$ e $NF = 74$ (Tabela 2, Figura 4a) e pequenos blocos heterocromáticos pericentroméricos nos cromossomos (Figura 4b). Também capturada no rio Uruguai, o exemplar de *R. capitonia* apresentou $2n = 64$ cromossomos, fórmula cariotípica de $4m+2sm+58st/a$ e $NF = 70$ (Figura 4c). O bandamento C evidenciou todo o braço curto do par m 1 marcado além de pequenos blocos pericentroméricos nos cromossomos (Figura 4d).

Localização dos sítios de rDNA

Rineloricaria latirostris das populações dos rios Laranjinha (diploide e triploide) e Barra Grande apresentaram o sítio de rDNA 18S localizado na região pericentromérica do conjunto cromossômico m 2 (Tabela 2, Figura 5a, b, c, respectivamente) coincidente ao bloco heterocromático desta região. Os cariomorfos A e B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande e *R. pentamaculata* do rio Juruba apresentaram os sítios do rDNA 18S em toda a extensão do braço curto heterocromático do maior par sm (Tabela 2, Figura 5d, e, f). A espécie *R. stellata* do rio Uruguai apresentou quatro pares portadores do rDNA 18S, sempre em localização terminal (Tabela 2, Figura 5g). Já *R. capitonia* do rio Uruguai apresentou o rDNA 18S

no braço curto heterocromático do par sm 3, o qual apresenta variação de tamanho do cistron entre os homólogos (Tabela 2, Figura 5h).

A FISH com sonda de rDNA 5S na população de *R. latirostris* do rio Laranjinha apresentou seis pares marcados, sendo um par m na região centromérica e cinco pares st/a em região terminal para o exemplar diploide (Tabela 2, Figura 6a) e os mesmos pares 3x para o exemplar triploide (Tabela 2, Figura 6b). Já a população de *R. latirostris* do rio Barra Grande apresentou quatro pares portadores do rDNA 5S, um par m na região centromérica e três pares st/a na região terminal (Tabela 2, Figura 6c). O cariomorfo A de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande apresentou cinco pares acrocêntricos com sítios de rDNA na região terminal (Tabela 2, Figura 6d), enquanto o cariomorfo B apresentou quatro pares portadores de rDNA 5S na região terminal (Tabela 2, Figura 6e). *Rineloricaria pentamaculata* do rio Juruba apresentou seis pares acrocêntricos com sítios de rDNA 5S na região terminal (Tabela 2, Figura 6f). Para o rio Uruguai, a espécie *R. stellata* apresentou seis pares portadores de rDNA 5S, sendo um par m com marcação centromérica além de cinco pares st/a com sítios terminais (Tabela 2, Figura 6g). Já *R. capitonia* apresentou quatro pares st/a com sítios terminais (Tabela 2, Figura 6h).

Localização da sequência TTAGGGn

A FISH com sonda TTAGGGn evidenciou os telômeros marcados além de vestígios ITS para as espécies *R. latirostris* e cariomorfo de *R. pentamaculata* (Figura 7). As populações de *R. latirostris* (rio Laranjinha e rio Barra Grande) evidenciaram dois pares m com vestígios ITS (Figura 7a, b, respectivamente), sendo um par co-

localizado ao rDNA 5S (Figura 7a, b, detalhes). O cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande também apresentou vestígio ITS em região centromérica de um par metacêntrico (Figura 7c). As demais espécies estudadas apresentaram apenas os sítios terminais para a localização telomérica (dados não mostrados).

Discussão

A família Loricariidae tradicionalmente é conhecida por apresentar $2n = 54$ cromossomos como caráter basal (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre estes, a subfamília Loricariinae é a que apresenta maior variação no número diploide: $2n = 36$ a $2n = 74$ cromossomos (ALVES et al., 2003), sendo que, apenas no gênero *Rineloricaria* a variação de $2n$ observada é de 36 a 70 cromossomos (KAVALCO et al., 2005). Neste estudo, foi detectado uma variação no $2n$ de 46 cromossomos nas populações de *R. latirostris* (Figura 2) até 64 cromossomos em *R. capitonia* (Figura 4). Estes resultados corroboram a proposta que os eventos de fusões/fissões Robertsonianas e as inversões pericêntricas são considerados os principais processos causadores da diversidade cariotípica observada na subfamília Loricariinae e são os responsáveis pela ampla variabilidade de mudanças numéricas e estruturais (GIULIANO-CAETANO, 1998; ALVES et al., 2003; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014). No entanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos que levam a estas quebras e rearranjos cromossômicos.

A espécie *R. latirostris* é conhecida por apresentar polimorfismos numéricos e variação no $2n$ entre populações de $2n = 36$ cromossomos à $2n = 48$ cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998). As duas populações de *R. latirostris* deste estudo (Laranjinha e Barra Grande) apresentaram $2n = 46$ cromossomos e a mesma organização cariotípica (Figura 2). Mesmo com a manutenção do $2n$, a análise dos marcadores de rDNA e sonda TTAGGGn por FISH indicam eventos de fusão Robertsoniana ocorreram na história evolutiva da espécie (Figura 7). Espécies de *Rineloricaria* com $2n$ superior a 54 cromossomos apresentam rDNA 18S em localização terminal de pares st (ERRERO-PORTO et al., 2010, 2011; ROSA et al., 2012) e rDNA 5S na região terminal de cromossomos acrocêntricos (ROSA et al., 2012). Em *R. lima* foram detectados sítios de rDNA 5S no ponto de fusão de cromossomos metacêntricos (ROSA et al., 2012). Nas populações de *R. latirostris* avaliadas, a ocorrência de um par m grande portador de rDNA 18S (Figura 5a, b, c), um par m grande portador de rDNA 5S co-localizado com sequências TTAGGGn, além de um terceiro par m grande portador de vestígios ITS, todos em localização centromérica (Figura 7a, b), podem ser indicativos de fusões entre pares st ou a. Estes resultados sustentam que inúmeros eventos de fusão ocorrem na diferenciação cariotípica desta espécie. Além disto, um exemplar triploide foi detectado para a população do rio Laranjinha (Figura 2c, d). Este exemplar pode ter tido origem pelo mecanismo de retenção do segundo corpúsculo polar ou polispermia (CUELLAR; UYENO, 1972), como já visualizado para outros peixes (CENTOFANTE et al., 2001; MALACRIDA et al., 2003; DA SILVA et al., 2011a, entre outros).

Entre os exemplares de *R. pentamaculata* avaliados, o $2n = 56$ cromossomos e a mesma organização cariotípica foi visualizado para exemplares das populações

dos rios Barra Grande e Juruba (Figura 3). Este $2n$ também já foi relatado para outras populações desta espécie no Alto Rio Paraná, com pequenas alterações de fórmula cariotípica resultantes de inversões pericêntricas (ERRERO-PORTO et al., 2010, 2011; MAIA et al., 2010) e parece ser o mais amplamente distribuído. Entretanto, no rio Barra Grande ocorre o cariomorfo B ($2n = 54$ cromossomos) em simpatria e sintopia ao cariomorfo A ($2n = 56$ cromossomos), sem evidências da formação de híbridos (Figura 3a, b c, d). A análise dos marcadores cromossômicos mostra pequena variação de número de sítios rDNA 5S e a ocorrência de vestígios ITS em um par metacêntrico do cariomorfo B (Figura 7c), indicando fusão Robertsoniana e redução numérica para a formação do $2n = 54$ cromossomos. Além da redução numérica, a comparação das fórmulas cromossômicas e NF indicam outros rearranjos cromossômicos na diferenciação dos cariomorfos.

Neste estudo, também são apresentados os primeiros resultados citogenéticos para *R. stellata* e *R. capitonia*, capturadas em simpatria e sintopia no rio Uruguai (Figura 4). A comparação dos cariótipos destas duas espécies evidenciou organizações cariotípicas divergentes, consistentes com o isolamento reprodutivo. *Rineloricaria stellata* apresentou $2n = 54$ cromossomos, enquanto *R. capitonia* reúne 64 cromossomos. Esta ampla variação de $2n$ é correlacionada ao aumento do número de pares acrocêntricos em *R. capitonia*, evento que pode ser atribuído às fissões cêntricas. Espécies de *Rineloricaria* com altos números diploides apresentam a maioria de seus cromossomos st/a quando comparados às espécies de $2n$ menores (MAIA et al., 2010; ROSA et al., 2012). *Rineloricaria stellata* tem 10 pares m/sm e 17 pares st/a, enquanto *R. capitonia* apresentou 3 pares m/sm e 29 pares st/a, com NF

próximos, 74 e 70, respectivamente, corroborando os eventos Robertsonianos na diversificação das espécies, além das inversões pericêntricas para alterações do NF.

O marcador cromossômico de rDNA 18S foi múltiplo em *R. stellata* e localizado apenas em um par sm em *R. capitonia* (Figura 5 g, h). Já o rDNA 5S apresentou sítios múltiplos em todas as espécies analisadas (Figura 6g, h). O número maior de sítios rDNA 18S para *R. stellata* e o alto número de sítios rDNA 5S pode ser associado a transposições destas famílias gênicas nos cariótipos ou sua associação com elementos transponíveis promovendo sua dispersão, como já encontrado em peixes (DA SILVA et al., 2011b; GORNUNG, 2013; SYMONOVÁ et al., 2013). Symonová et al. (2013) propuseram que em alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de dispersão dos elementos transponíveis para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos. Além das espécies aqui estudadas, diferenças no número e fenótipos de sítios de rDNA também foram detectados em *R. lanceolata* (ERRERO-PORTO et al., 2014), indicando que a distribuição e dispersão destes DNAs repetitivos contribuem com a diversificação genômica no gênero.

Além da movimentação dos DNAs repetitivos e seu poder mutacional em gerar rearranjos cromossômicos (KIDWELL; LISH, 2001; KIDWELL, 2002), outro fator que pode ser correlacionado aos inúmeros rearranjos Robertsonianos em *Rineloricaria* é a provável instabilidade dos telômeros. Perry et al. (2004) propuseram que ITS tornam os cromossomos susceptíveis a novas quebras e ocorrências de rearranjos cromossômicos, tais como as fissões. As fusões cromossômicas são atribuídas aos mecanismos de encurtamento e inativação dos telômeros, a presença de regiões descondensadas de DNA e, a ocorrência de sequências repetitivas

terminais dos cromossomos similares àsquelas encontradas nos centrômeros (SHAMPAY et al., 1995; SLIJEPCEVIC, 1998; OCALEWICZ, 2013). Em *R. lima* os mecanismos de instabilidade dos telômeros e fusão de pares acrocêntricos além da fusão de pares acrocêntricos portadores de rDNA 5S em região terminal foram utilizados para explicar a variação cromossômica (ROSA et al., 2012).

Neste estudo é proposto que a localização terminal em pares st/a de sequências repetitivas para algumas espécies, tais como os rDNAs, proporcionam regiões descondensadas e com sequências similares para o evento de fusão Robertsoniana (Figura 7). Este fato é corroborado pela localização centromérica destes rDNAs em cromossomos m de espécies com $2n$ menores. Além destes rearranjos, as fusões terminal para terminal de cromossomos acrocêntricos (*end to end fusions*) ajudam a formar a organização cariotípica de espécies de números diploides baixos de *Rineloricaria*. Em direção oposta, espécies com tendência ao aumento do $2n$ teria fissões cêntricas como principal mecanismo da diferenciação cariotípica. Diante destes dados, os resultados citogenéticos no gênero *Rineloricaria* indicam que a instabilidade telomérica, as inversões e os eventos Robertsonianos têm auxiliado nos mecanismos da diversificação cariotípica das espécies com a provável ocorrência de DNAs repetitivos em pontos quentes para os rearranjos cromossômicos.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo:), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SETI (Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná), Fundação Araucária (Fundação

Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências

As referências encontram-se no final da dissertação

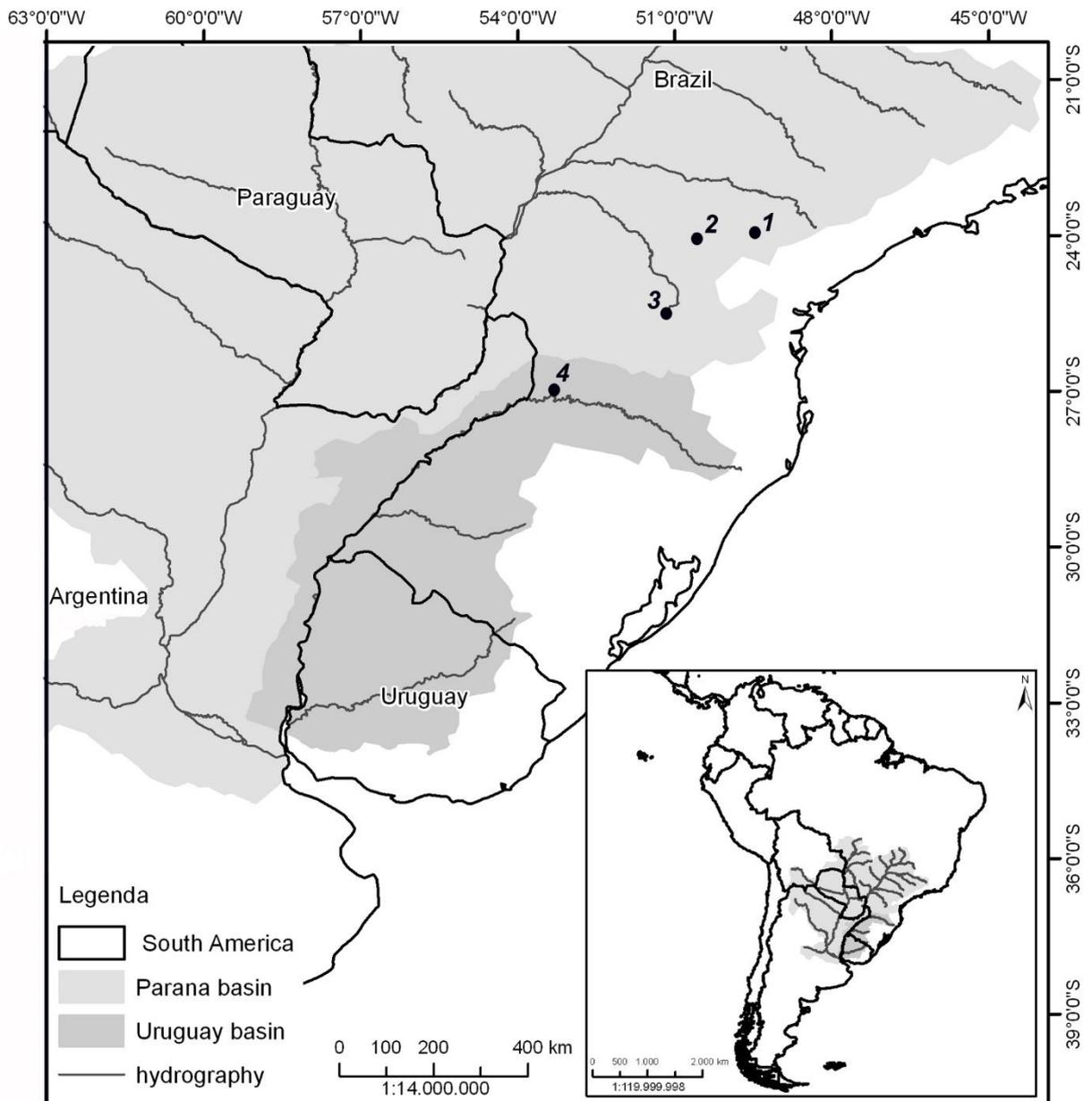


Figura 1. Mapa parcial da América do Sul, com destaque para a bacia do rio Paraná, mostrando os pontos de captura das populações de *Rineloricaria*. O número 1 indica o rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas, (*R. latirostris*); no ponto 2 está o rio Juruba, bacia do rio Tibagi (*R. pentamaculata*); no 3 o rio Barra Grande (*R. latirostris* e *R. pentamaculata*, cariomorfos A e B); no 4 o rio Uruguai, bacia do rio Uruguai (*R. stellata* e *R. capitonia*).

Tabela 1. Espécies de *Rineloricaria* estudadas, pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de exemplares analisados. As espécies foram identificadas pelo Dr. Cláudio Henrique Zawadzki e mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA).

Espécies	Rio/ Cidade (Estado)	Bacia hidrográfica	Localização (GPS)	N° ♂	N° ♀
<i>R. latirostris</i>	Rio Laranjinha/ Ventania (PR)	Cinzas	-23°58'13" e -50°14'01"	5	7
<i>R. latirostris</i>	Rio Barra Grande/ Prudentópolis (PR)	Ivaí	-25°05'21" e -50°57'22"	6	4
<i>R. pentamaculata</i>	Rio Barra Grande/ Prudentópolis (PR)	Ivaí	-25°05'21" e -50°57'22"	9	7
<i>R. pentamaculata</i>	Rio Juruba/ Apucarana (PR)	Tibagi	-23°34'22" e -51°23'08"	11	15
<i>R. stellata</i>	Rio Uruguai/ São Carlos (SC)	Uruguai	-27°05'21" e -53°01'01"	8	8
<i>R. capitonia</i>	Rio Uruguai/ São Carlos (SC)	Uruguai	-27°05'21" e -53°01'01"	1	0

N° ♂ = número de machos; N° ♀ = número de fêmeas; PR = Paraná; SC = Santa Catarina.

Tabela 2. Relação de espécies/populações de *Rineloricaria* estudadas quanto ao número diploide, fórmula cariotípica, localização e número de sítios de rDNA, e presença de sítios teloméricos intersticiais.

Espécie	N	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	NF	rDNA 18S	rDNA 5S	ITS
<i>R. latirostris</i> diploide	11	Rio Laranjinha	46	10m+4sm+32st/a	60	1 par m Intersticial	1 par m centromérico + 5 pares st/a terminais	2 pares m centroméricos
<i>R. latirostris</i> triploide	1	Rio Laranjinha	3x=69	15m+6sm+48st/a	90	1 par 3x m Intersticial	1 par 3x m centromérico + 5 st/a pares 3x terminais	Não avaliado
<i>R. latirostris</i>	10	Rio Barra Grande	46	10m+4sm+32	60	1 par m intersticial	1 par m centromérico + 3 pares st/a terminais	2 pares m centroméricos
<i>R. pentamaculata</i> (Cariomorfo A)	10	Rio Barra Grande	56	4m+10sm+42st/a	70	1 par sm terminal	5 pares st/a terminais	Ausente
<i>R. pentamaculata</i> (Cariomorfo B)	6	Rio Barra Grande	54	6m+4sm+44st/a	64	1 par sm terminal	4 pares st/a terminais	1 par m centromérico
<i>R. pentamaculata</i>	16	Rio Juruba	56	4m+10sm+42st/a	70	1 par sm terminal	6 pares st/a terminais	Ausente
<i>R. stellata</i>	16	Rio Uruguai	54	6m+14sm+34st/a	74	4 pares terminais	1 par m centromérico + 5 pares st/a terminais	Ausente
<i>R. capitionia</i>	1	Rio Uruguai	64	4m+2sm+58st/a	70	1 par sm terminal	4 pares st/a terminais	Ausente

Legenda: N = número de exemplares; 2n = número diploide; NF = número fundamental; rDNA 18S = número e localização de sítios de rDNA 18S; rDNA 5S = número e localização de sítios de rDNA 5S; ITS = sítios teloméricos intersticiais.

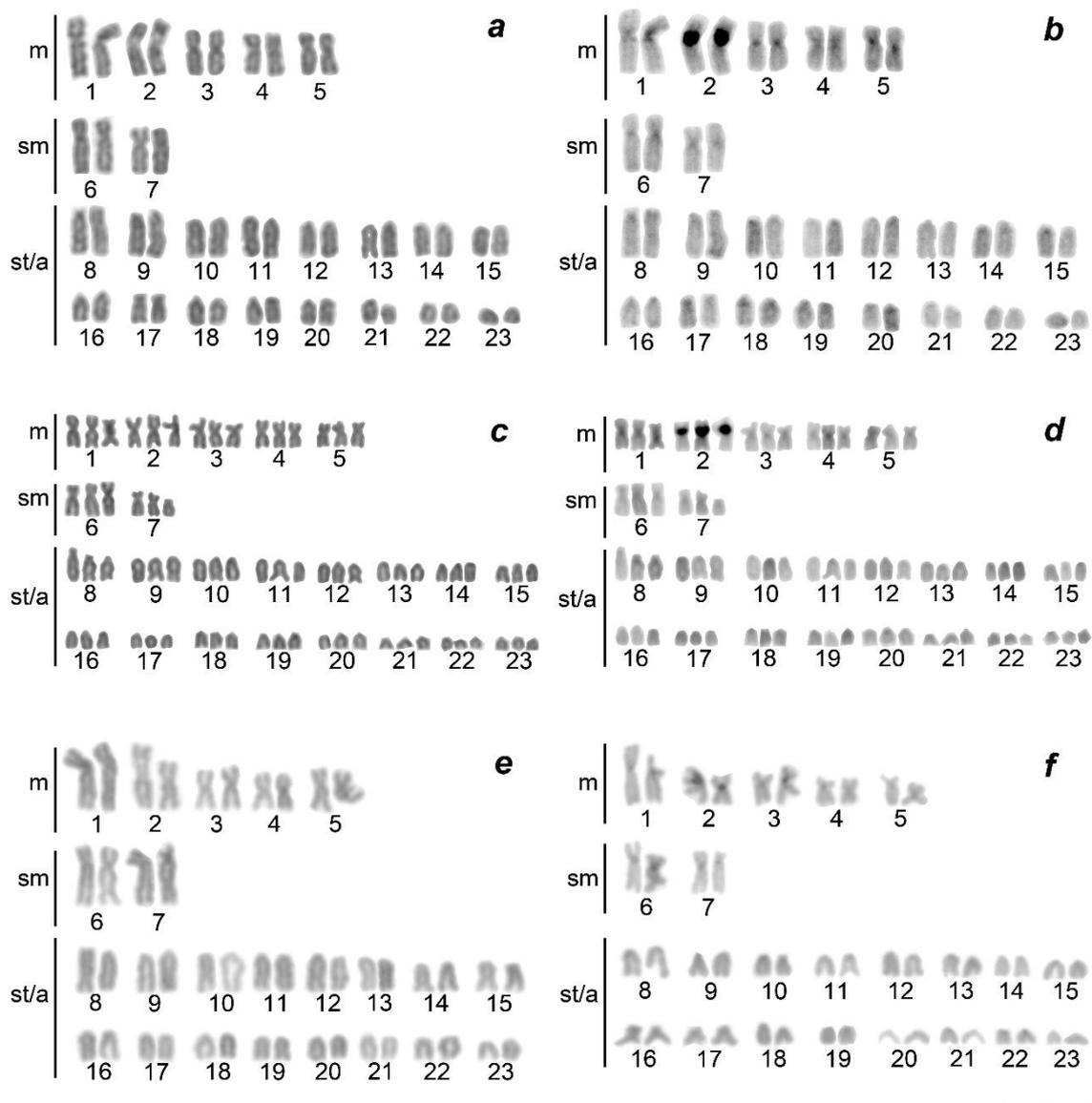


Figura 2. Cariótipos de exemplares de *R. latirostris*. Em (a, b) cariótipo diploide do rio Laranjinha; (c, d) cariótipo triploide do rio Laranjinha; (e, f) cariótipo do rio Barra Grande. Em a, c, e coloração convencional por Giemsa e b, d, f bandamento C, respectivamente. A barra representa 10 μ m.

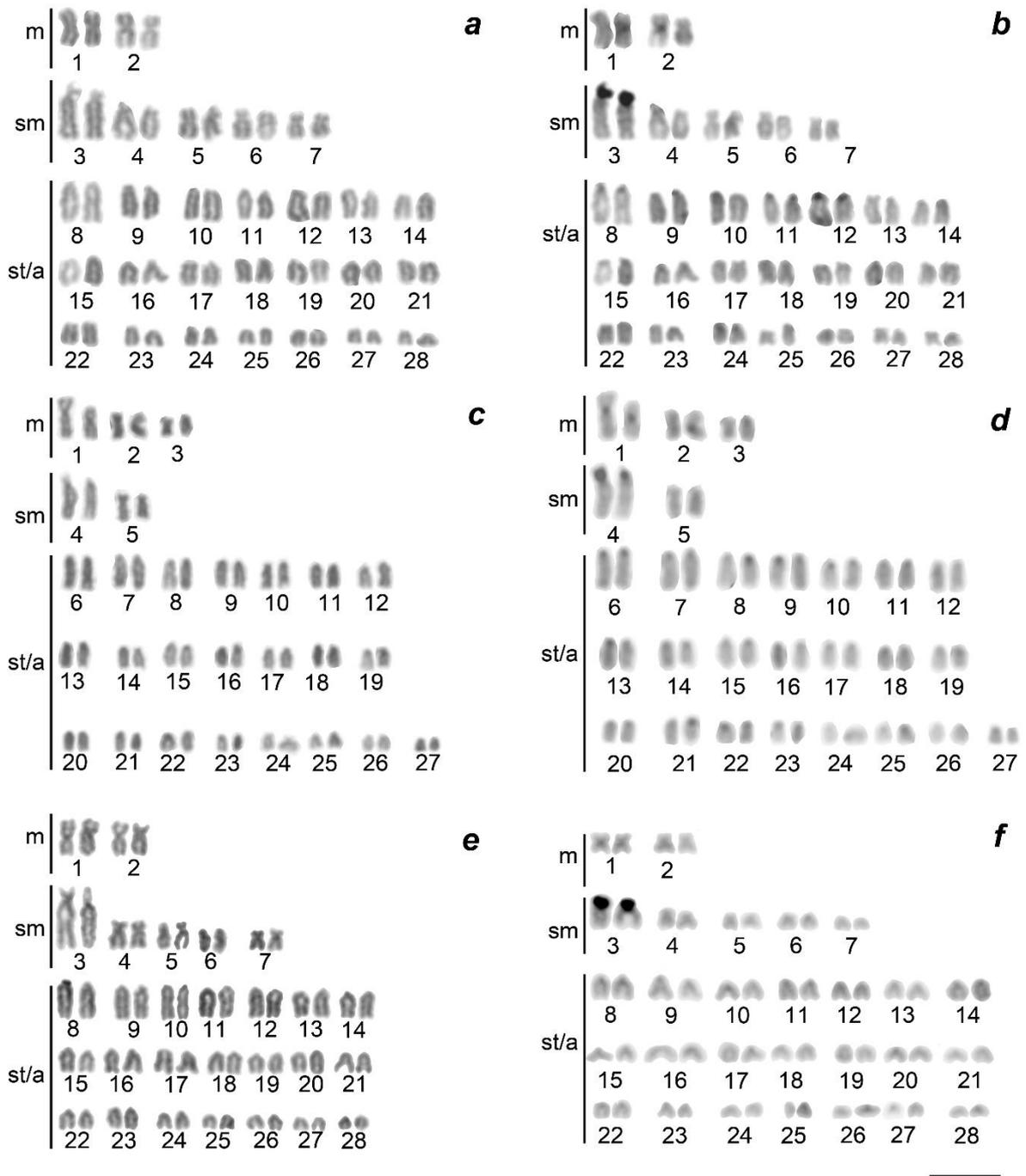


Figura 3. Cariótipos de exemplares de *R. pentamaculata*. Em (a, b) cariomorfo A do rio Barra Grande; (c, d) cariomorfo B do rio Barra Grande; (e, f) cariótipo do rio Juruba. Em a, c, e coloração convencional por Giemsa e b, d, f bandamento C, respectivamente. A barra representa 10 µm.

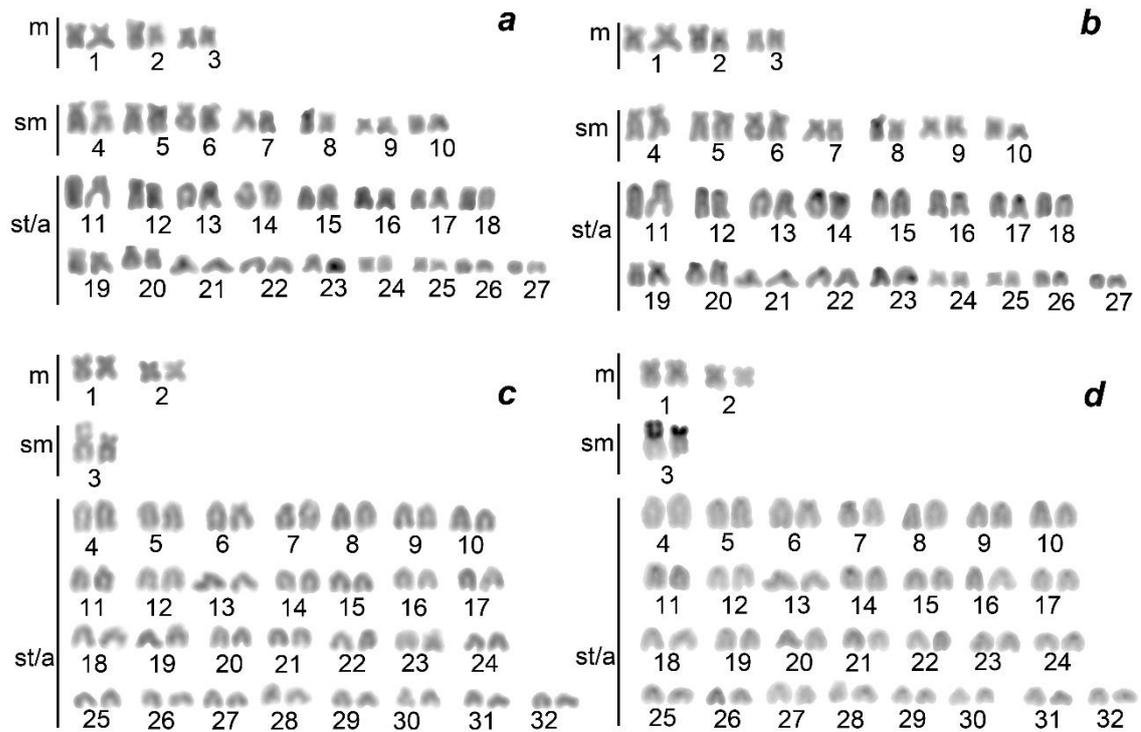


Figura 4. Cariótipos de *R. stellata* (a, b) e *R. capitonia* (c, d) do rio Uruguai. Em a, c coloração convencional por Giemsa e b, d bandamento C, respectivamente. A barra representa 10 μ m.

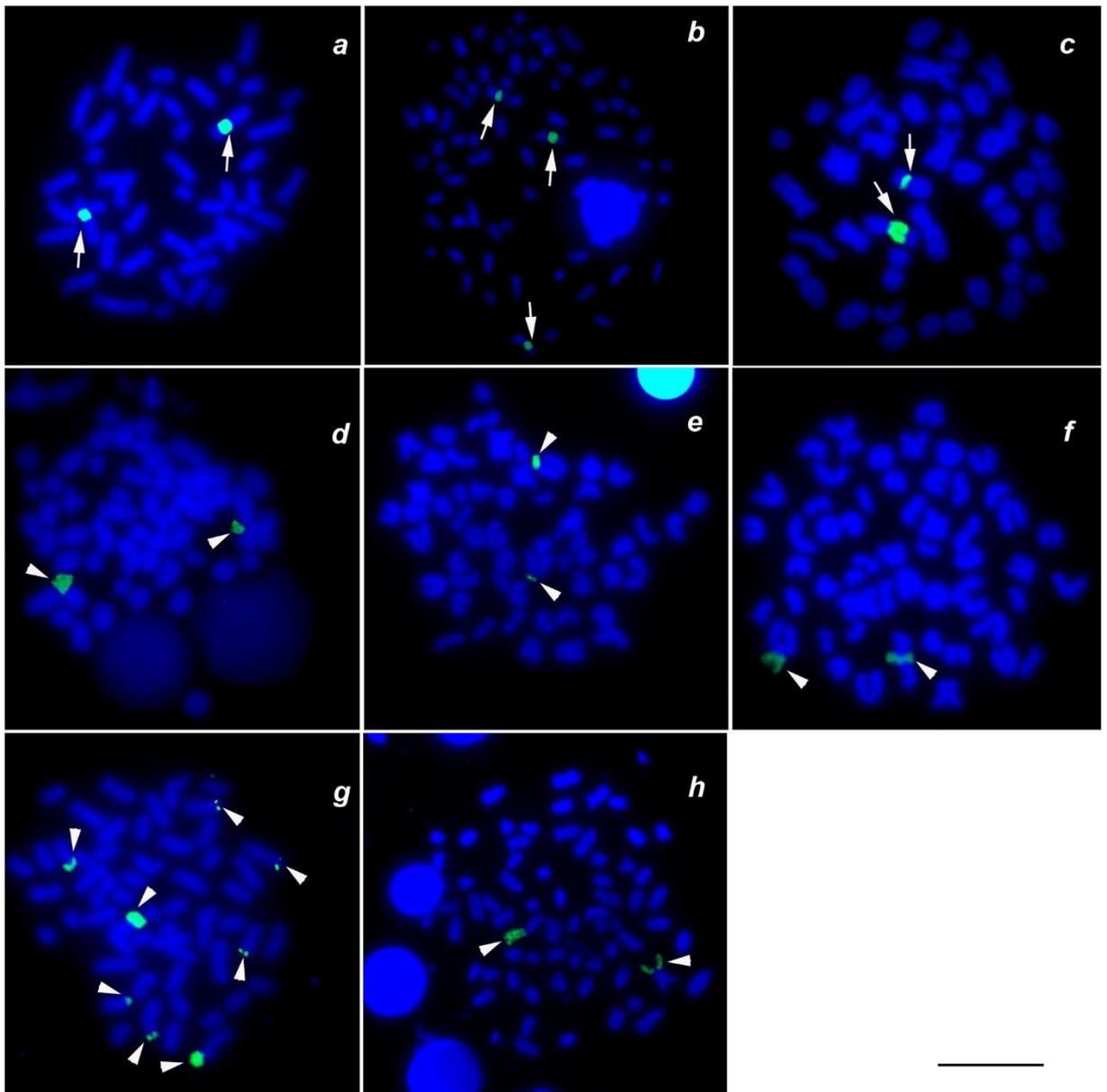


Figura 5. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda de rDNA 18S. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha; (b) *R. latirostris* triploide do rio Laranjinha; (c) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (d) cariomorfo A de *R. pentamaculata* diploide do Barra Grande; (e) cariomorfo B de *R. pentamaculata* diploide do rio Barra Grande; (f) *R. pentamaculata* do rio Juruba; (g) *R. stellata* do rio Uruguai e; (h) *R. capitonia* do rio Uruguai. As cabeças de setas apontam sítios terminais e as setas sítios centroméricos. A barra representa 10 μ m.

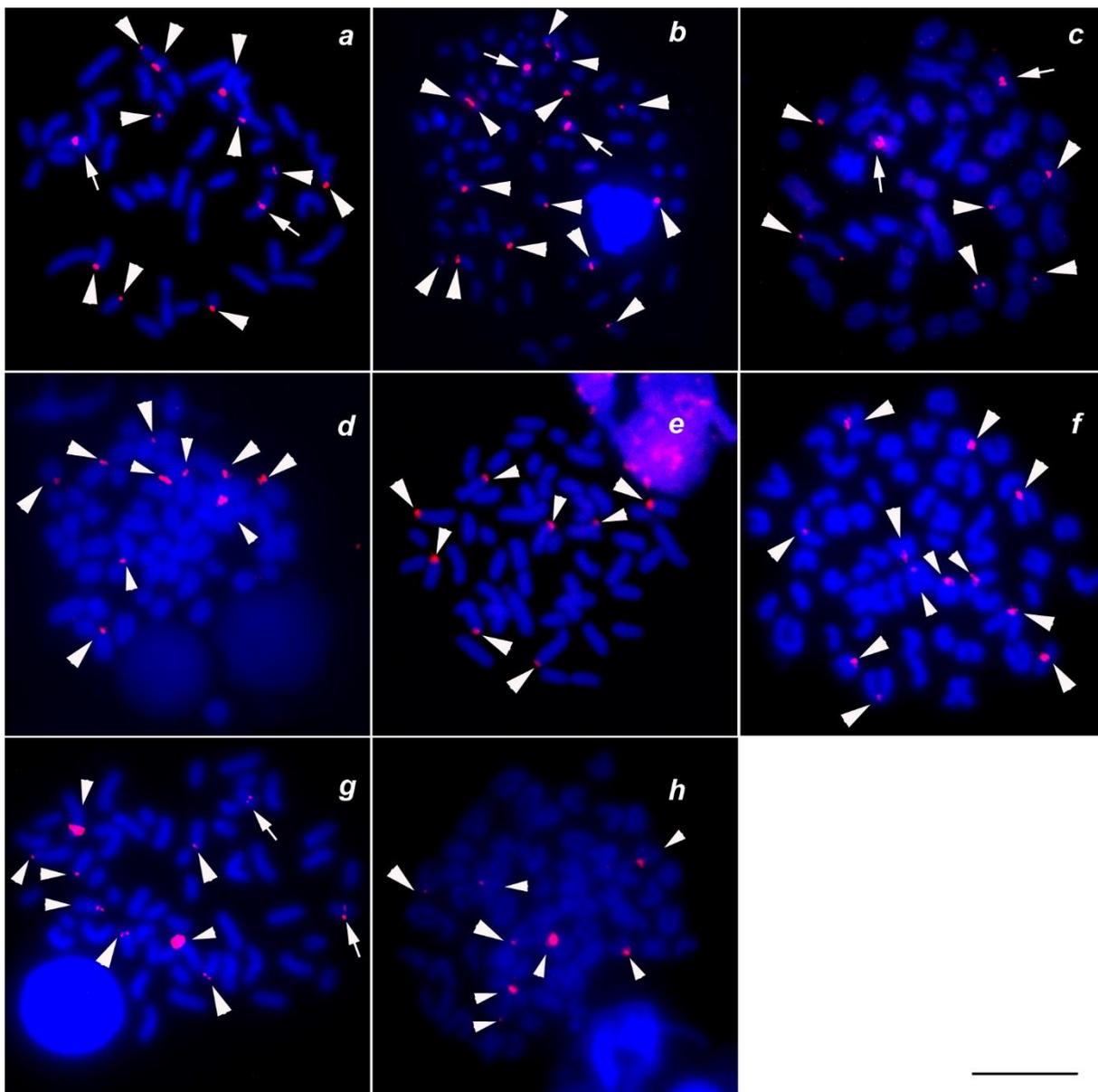


Figura 6. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda de rDNA 5S. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha; (b) *R. latirostris* triploide do rio Laranjinha; (c) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (d) cariomorfo A de *R. pentamaculata* diploide do Barra Grande; (e) cariomorfo B de *R. pentamaculata* diploide do rio Barra Grande; (f) *R. pentamaculata* do rio Juruba; (g) *R. stellata* do rio Uruguai e; (h) *R. capitoria* do rio Uruguai. As cabeças de setas apontam sítios terminais e as setas sítios centroméricos. A barra representa 10 μ m.

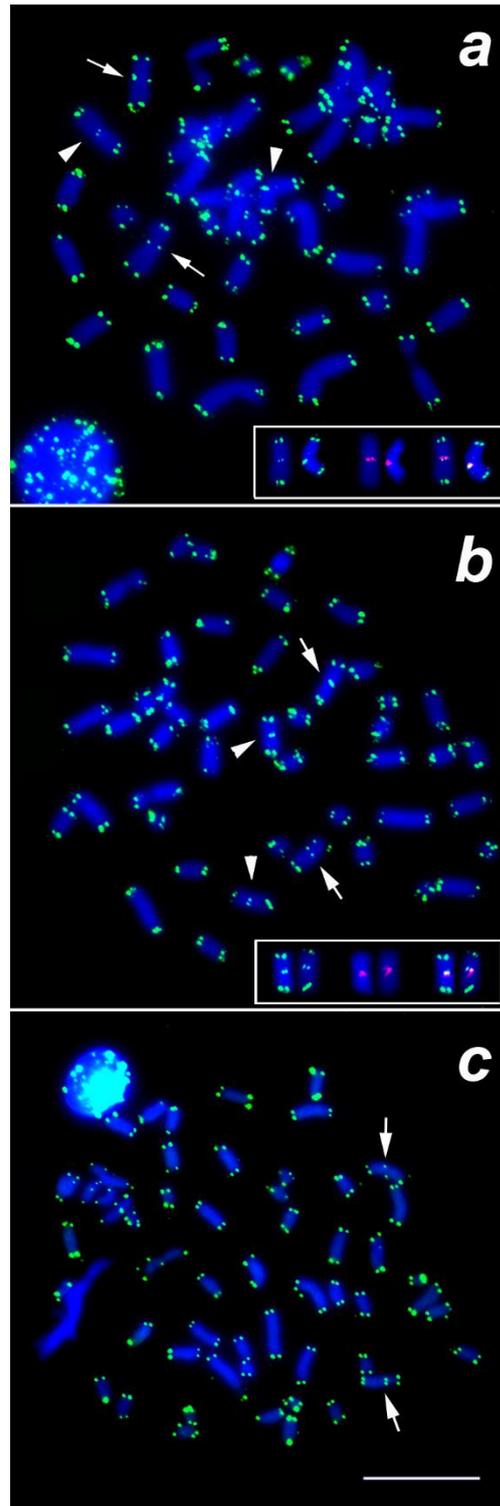


Figura 7. Metáfases de espécies de *Rineloricaria* submetidas à FISH com sonda TTAGGGn. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha, (b) *R. latirostris* do rio Barra Grande; (c) cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande. As setas apontam os vestígios ITS. As cabeças de setas apontam os cromossomos metacêntricos com marcações co-localizadas de sondas TTAGGGn e rDNA 5S apontados nos detalhes das imagens a-b. A barra representa 10 μ m.

Capítulo II

Comunicação breve

Análise citogenética e molecular do elemento transponível *Tc1-Mariner Like* em espécies de *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)

Resumo

O transposon *Tc1-Mariner* foi isolado e localizado *in situ* em espécies do gênero *Rineloricaria* com o objetivo de verificar a associação deste elemento transponível (TE) aos múltiplos sítios de rDNA 5S e os pontos de fusão cromossômica neste grupo de peixes. A análise citogenética mostrou que não há co-localização do *Tc1-Mariner Like* e os sítios de rDNA 5S, portanto, sem evidências de que este TE possa promover espalhamento do rDNA 5S em *Rineloricaria*. A análise molecular das sequências *Tc1-Mariner Like* evidenciou intensa degeneração molecular para os domínios da transposase. Desta forma, estes resultados demonstram a falta de atividade de TE das sequências *Tc1-Mariner Like* obtidas e discute sua provável atuação em outras funções genômicas em *Rineloricaria*.

Palavras-chave: evolução cariotípica, FISH, rDNA 5S, transposon.

Introdução

Dentre as classes de sequências repetitivas conhecidas, os elementos transponíveis (TEs) têm sido estudados visto a sua importância em modular eventos biológicos, especialmente no que se refere a processos evolutivos. Podem ser divididos em duas classes, de acordo com sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição: classe I, ou retrotransposons (RTEs), os quais utilizam um intermediário de RNA; e, classe II, ou transposons, que utilizam o DNA para se propagar pelo genoma (BÖHNE, 2008). Dentre as subclasses existentes em transposons, podemos citar a superfamília *Tc1-Mariner*, que se destaca por ter a maior distribuição na natureza. Esses elementos possuem entre 1000 - 5000 pb (pares de bases) e são caracterizados por apresentar uma fase aberta de leitura (ORF – *open reading frame*), a qual codifica a transposase, flanqueada por duas repetições terminais invertidas (TIRs – *terminal inverted repeats*). Embora sejam divergentes em sua sequência primária (apresentam aproximadamente 15% de identidade entre aminoácidos de transposases de diferentes famílias) (ROBERTSON, 1995), os membros da superfamília *Tc1-Mariner* são provavelmente monofiléticos em sua origem (ROBERTSON, 1995; CAPY et al., 1996). Em peixes, os TEs têm sido estudados especialmente em relação à organização estrutural e mapeamento físico nos cromossomos (da SILVA et al., 2002; BOUNEAU et al., 2003; FISCHER et al., 2004; OZOUF-COSTAZ et al., 2004; MAZZUCHELLI; MARTINS, 2009; TEIXEIRA et al., 2009; FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2010; SCZEPANSKI et al., 2013; SCHEMBERGER et al., 2014).

Loricariidae é a maior família da ordem Siluriformes e é subdividida em sete subfamílias (ESCHEMEYER; FONG, 2015). *Rineloricaria* Bleeker, 1862 é o gênero

mais especioso da subfamília Loricariinae (ERRERO-PORTO et al., 2014) e apresenta uma ampla variação cariotípica, desde *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) com o menor número diploide ($2n = 36$ cromossomos), até *Rineloricaria* sp. e *Rineloricaria* cf. *lima* (Kner, 1853) com um $2n = 70$ cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998; ALVES et al., 2003; RODRIGUES; ALMEIDA–TOLEDO, 2008; ROSA et al., 2012). Estudos demonstraram que tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas, poderiam explicar a variação do $2n$ presente em algumas espécies de *Rineloricaria* (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014).

Em Gymnotiformes, da Silva et al. (2011) localizaram *in situ* clusters múltiplos do rDNA 5S, fato atribuído ao envolvimento do TE *Tc1-Mariner* presente na região espaçadora (NTS - *non-transcribed spacer sequence*) do DNA ribossomal, que contribuiria para o espalhamento deste rDNA na espécie analisada. Tidos como pontos quentes de mutação, análises citogenéticas e moleculares evidenciam o papel dos TEs nos rearranjos cromossômicos. Visto a extensa variação cariotípica presente em Loricariidae, a presença de múltiplos sítios de rDNAs 5S em algumas espécies de *Rineloricaria* (Capítulo I) e a ausência de estudos que relacionem o envolvimento de TEs aos rearranjos/inversões, o mapeamento físico e análise molecular do elemento *Tc1-Mariner* em espécies deste gênero poderia contribuir para o entendimento da diversificação cromossômica presente neste grupo.

Material e métodos

Foram analisados citogeneticamente 81 exemplares de diferentes espécies/populações do gênero *Rineloricaria* nas seguintes localidades: *R. latirostris*, rio Laranjinha (Ventania/PR); *R. latirostris* e *R. pentamaculata*, rio Barra Grande (Prudentópolis/PR); *R. pentamaculata*, rio Juruba (Apucarana/PR); *R. stellata* e *R. capitonia*, rio Uruguai (São Carlos/SC). O manejo dos peixes e os procedimentos laboratoriais estão de acordo com o Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) e o Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 007/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo Fenocchio et al. (1991) e Blanco et al. (2012a). A extração do DNA genômico de fígado foi realizada pelo método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980). Para a localização física nos cromossomos pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) (PINKEL et al., 1986), foram utilizadas as sondas: i) rDNA 5S (MARTINS; GALETTI Jr., 1999) marcada por PCR utilizando-se digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science); e, ii) *Tc1-Mariner* marcado com *Biotin-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science). O TE foi obtido por amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), utilizando-se como molde o DNA genômico extraído dos espécimes, bem como *primers* sintetizados para as regiões flangeadoras das TIRs, a partir do genoma de *Danio rerio* (SCHEMBERGER et al., 2012). Fragmentos em torno de 1200 pb foram isolados, clonados e sujeitos ao sequenciamento nucleotídico. Posteriormente, o clone obtido de *R. latirostris* do rio Laranjinha (escolhido por apresentar maior integridade do *Tc1-Mariner*) foi marcado com o kit *Biotin-Nick Translation Mix* (Roche

Applied Science) para uso como sonda na FISH para mapeamento do *Tc1-Mariner* em todas as espécies estudadas.

Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science) e streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Foram analisadas aproximadamente 30 metáfases.

As sequências de TEs obtidas foram submetidas à análise em base de dados de DNAs repetitivos de referência para sequências repetitivas e TEs, utilizando-se: *CENSOR online software* (JURKA et al., 2005), para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados; software *Geneious 4.8.5* (DRUMMOND et al., 2009), para alinhamento e tradução das sequências e banco de dados *Pfam* (FINN et al., 2010) para identificação de domínios proteicos.

Resultados

Os resultados citogenéticos mostraram número diploide ($2n$) de 46 cromossomos para *R. latirostris* dos rios Laranjinha e Barra Grande; $2n = 56$ cromossomos para o cariomorfo A de *R. pentamaculata* dos rios Barra Grande e Juruba; $2n = 54$ cromossomos para o cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande; $2n = 54$ cromossomos para *R. stellata* e $2n = 64$ cromossomos para *R.*

capitonia, ambas do rio Uruguai (Figura 2, 3, 4). A FISH com sonda do elemento *Tc1-Mariner Like* mostrou sinais dispersos pelos cromossomos de todas as espécies analisadas, sem a associação com sítios preferenciais de acúmulo (Figura 8).

A FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou seis pares marcados em *R. latirostris* do rio Laranjinha (Figura 6a, b), quatro pares portadores do rDNA 5S para *R. latirostris* do rio Barra Grande (Figura 6c), cinco pares com sítios rDNA 5S no cariomorfo A de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande (Figura 6d), quatro pares no cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande (Figura 6e), seis pares em *R. pentamaculata* do rio Juruba (Figura 6f). Para o rio Uruguai, a espécie *R. stellata* apresentou seis pares portadores de rDNA 5S (Figura 6g) e quatro pares em *R. capitonia* (Figura 6h). Os sítios do elemento *Tc1-Mariner Like* não foram co-localizados ao rDNA 5S (Figura 8).

As sequências nucleotídicas obtidas a partir da amplificação do TE *Tc1-Mariner* evidenciaram a presença de transposons compostos, com sequências truncadas e ausência de ORFs íntegras (Tabela 3). A análise de similaridade realizada utilizando-se o software CENSOR revelou que a sequência do *Tc1-Mariner Like* em *R. latirostris* do rio Laranjinha apresentou 1081 pb, e identidade média de 81,24% com o *Tc-1 Mariner* de *Danio rerio* (*TC1DR3*), porém com presença de inúmeros *gaps* em sua sequência original (Tabela 3, Figura 8h). Em *R. pentamaculata* do rio Juruba a sequência amplificada possui 1183 pb, com trechos apresentando identidade aos elementos *Tc1-Mariner* de *D. rerio* (*TC1DR3*), *Tc1-Mariner* de *Takifugu rubripes* (*TC1-FR1*), aos LINEs (*long interspaced nuclear element*) *Penelope-5 XT* e *Penelope-6 XT* de *Xenopus tropicalis*, ao SINE (*short interspaced nuclear element*) *Ruka* de *Ixodida* e LINE *L2-2 SSa* de *Salmo salar* (Tabela 3, Figura 8i). Em *R. stellata* a sequência

amplificada detém 1326 pb, com segmentos de identidade aos transposons *Tc1-Mariner* de *D. rerio* (*TC1DR3*), *Helitron-2 DR* de *D. rerio*, *DNA-4-2 NV* de *Nematostella vectensis*, *hat-N2 AP* e *DNA8-74 AP* de *Acyrtosiphon pisum*, *Helitron-N2 XT* de *Xenopus tropicalis* e *Mariner RC1 FR1* de *Takifugu rubripes* (Tabela 3, Figura 8j). A sequência clonada a partir de *R. capitonia* (rio Uruguai) apresentou 670 pb e segmentos de identidade ao transposon *TC1DR3*, porém nenhuma ORF pôde ser identificada. Em *R. pentamaculata* de Barra Grande a sequência do TE *Mariner* ainda não foi obtida. Ainda, confrontando as sequências protéicas obtidas, utilizando-se o software Geneious 4.8.5, com domínios protéicos depositados no banco de dados pFam, não foram obtidos resultados positivos.

Discussão

É conhecido que os peixes da subfamília Loricariinae apresentam ampla diversidade cariotípica (ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al. 2014), e que os DNAs repetitivos constituem pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos entre os eucariotos (KIDWELL, 2002). Symonová et al. (2013) propuseram que em alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de espalhamento dos TEs para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos.

Alguns estudos indicam haver uma relação entre a dispersão do rDNA 5S pelo genoma e TEs em peixes (REBORDINOS et al., 2013). Fragmentos dos retrotransposons (RTEs) dos tipos LINE (*long interspersed nuclear element*) CR1–79_HM e LTR_(*long terminal repeats*) Gypsy foram encontrados no NTS de *Diplodus*

sargus (MERLO et al., 2013). Da Silva et al. (2011) sequenciaram fragmentos de NTS do rDNA 5S de espécies de Gymnotiformes e atribuíram ao TE *Tc1-Mariner* encontrado nestas regiões, a dispersão deste rDNA em pelo menos 19 pares de cromossomos de *Gymnotus paraguayensis*, detectado por meio da FISH.

As espécies de *Rineloricaria* avaliadas neste estudo apresentam inúmeros pares de cromossomos portadores do cluster de rDNA 5S, com alguns destes localizados na região centromérica de cromossomos metacêntricos oriundos de fusão cêntrica (Figura 6). Os dados da dupla FISH rDNA 5S e TE *Tc1-Mariner Like* nas espécies de *Rineloricaria* analisadas não evidenciaram associação entre as sequências de rDNA 5S e *Tc1-Mariner Like*, já que as marcações do TE estão dispersas nos cromossomos e não co-localizadas ao rDNA 5S. Ainda, as análises das sequências nucleotídicas do elemento *Mariner* não evidenciaram segmentos com identidade ao rDNA 5S. Diante deste fato, o papel da dispersão dos sítios de rDNA 5S e as fusões/fissões cromossômicas comuns neste gênero não podem ser correlacionadas ao elemento *Tc1-Mariner*. É provável que outros elementos transponíveis possam estar envolvidos com a dispersão do rDNA 5S e as fusões cromossômicas detectadas em *Rineloricaria*.

O sequenciamento nucleotídico dos clones *Tc1-Mariner Like* em quatro espécies de *Rineloricaria* evidenciaram ausência de ORFs ativas e elevado grau de degeneração molecular, o que pode interferir fortemente na sua atividade como TE propriamente dito (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012; ABRUSAN et al., 2013). Nas espécies *R. pentamaculata* e *R. stellata* foram obtidos clones de *Tc1-Mariner* com inserção de inúmeros outros elementos transponíveis entre as extremidades, sendo caracterizados como transposons compostos. Entre os eucariotos, a grande maioria

dos TEs nos genomas está presente como cópias não autônomas geradas como resultado de um processo de degeneração, uma vez que quando inativados acumulam mutações perdendo sua identidade. Geralmente, o “ciclo de vida” de um TE consiste na invasão no genoma hospedeiro, aumento do seu número de cópias, sua inativação e, por fim a eliminação (KIDWELL, 2001). Alguns TEs mutados podem passar por um processo evolutivo de “domesticação molecular”, no qual ele perde sua característica de TE e adquire novas funções genômicas a favor do hospedeiro (SINZELLE et al., 2009), tais como na regulação gênica tanto a nível transcricional (geração de sítios de ligação a fatores de transcrição), como a nível pós-transcricional (edição de RNAs ou atuação na tradução) (FESCHOTTE, 2008; HERPIN et al., 2010). Desta forma, devido a intensa degeneração molecular dos elementos *Tc1-Mariner Like* de *Rineloricaria* é provável que estes atuem para outras funções, ou ainda, permaneçam com material inerte no genoma.

As combinações de transposons e RTEs encontradas nas sequências *Tc1-Mariner Like* de *Rineloricaria* podem ter sido formadas por *crossing-over* desigual entre TEs próximos, ou indicar a invasão de um TE dentro de outro (SCHEMBERGER et al., 2014). As sequências obtidas neste estudo podem ser correlacionadas à miniatura de TEs (MITEs - *miniatures of the transposable element*), pois apresentam as extremidades com maior identidade ao Mariner e ausência ou intensa degeneração do domínio da transposase (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012). Cópias de TEs íntegros e autônomas são raras nos genomas de eucariotos, enquanto sequências degeneradas e não autônomas são as mais frequentes (MUÑOZ-LÓPEZ, 2010). Neste estudo, a não obtenção de clones *Tc1-Mariner* completos pode ser devido ao

menor número de sequências íntegras nos genomas destas espécies, como já destacado para outros organismos (MUÑOZ-LÓPEZ, 2010).

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo não mostram associação entre o elemento *Tc1-Mariner* e a dispersão de sítios de rDNA 5S e eventos Robertsonianos em *Rineloricaria*, com já observado em outros peixes. Ainda, as sequências obtidas podem ser caracterizadas como sendo *Tc1-Mariner Like*, as quais estão intensamente degeneradas e sem função de TE. Entretanto, estas sequências degeneradas podem estar relacionadas a outras funções genômicas nas espécies avaliadas.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo:), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SETI (Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências

As referências encontram-se no final da dissertação.

Tabela 3. Caracterização da sequência nucleotídica do TE *Tc1-Mariner Like* obtido a partir de espécies de *Rineloricaria*, segundo software CENSOR.

Espécie	Nome do TE	Posição do nucleotídeo do TE	Posição do nucleotídeo do TE de referência (CENSOR)	Classe	Orientação*	Grau de similaridade
<i>R. latirostris</i> (rio Laranjinha)	<i>TC1DR3</i>	1-555	1-601	DNA	d	0,8217
	<i>TC1DR3</i>	573-1081	668-1225	DNA	d	0,8031
<i>R. pentamaculata</i> (rio Juruba)	<i>TC1DR3</i>	13-310	89-418	DNA	d	0,7855
	<i>TC1 FR1</i>	331-619	652-951	DNA/Mariner	d	0,7840
	<i>Penelope-5 XT</i>	641-680	2807-2846	NonLTR/Penelope	c	0,8780
	<i>Penelope-6 XT</i>	718-781	2491-2553	NonLTR/Penelope	d	0,8000
	<i>Ruka</i>	844-905	6-67	NonLTR/SINE/SINE2	d	0,7258
	<i>L2-2 SSa</i>	969-1017	3984-4032	NonLTR/L2	d	0,8776
	<i>TC1DR3</i>	1018-1183	1019-1214	DNA	d	0,8070
<i>R. stellata</i> (rio Uruguai)	<i>TC1DR3</i>	1-133	1084-1225	DNA	c	0,8074
	<i>TC1DR3</i>	157-348	52-308	DNA	c	0,8477
	<i>Helitron-2 DR</i>	361-428	2890-2960	DNA/Helitron	d	0,7183
	<i>DNA-4-2 NV</i>	678-752	323-386	DNA	d	0,7794
	<i>hat-N2 AP</i>	760-870	582-688	DNA/hat	d	0,7570
	<i>DNA8-74 AP</i>	910-1011	119-212	DNA	d	0,7753
	<i>Helitron-N2 XT</i>	1242-1285	1257-1299	DNA/Helitron	d	0,8409
	<i>RC1 FR1</i>	1290-1326	1184-1220	DNA/Mariner	d	0,8378
<i>R. capitonia</i> (rio Uruguai)	<i>TC1DR3B</i>	2-54	837-889	DNA/Mariner	c	0,8679
	<i>TC1DR3</i>	113-670	1-752	DNA	c	0,8462

*Orientação do fragmento, c indica a fita complementar e d indica a fita direta.

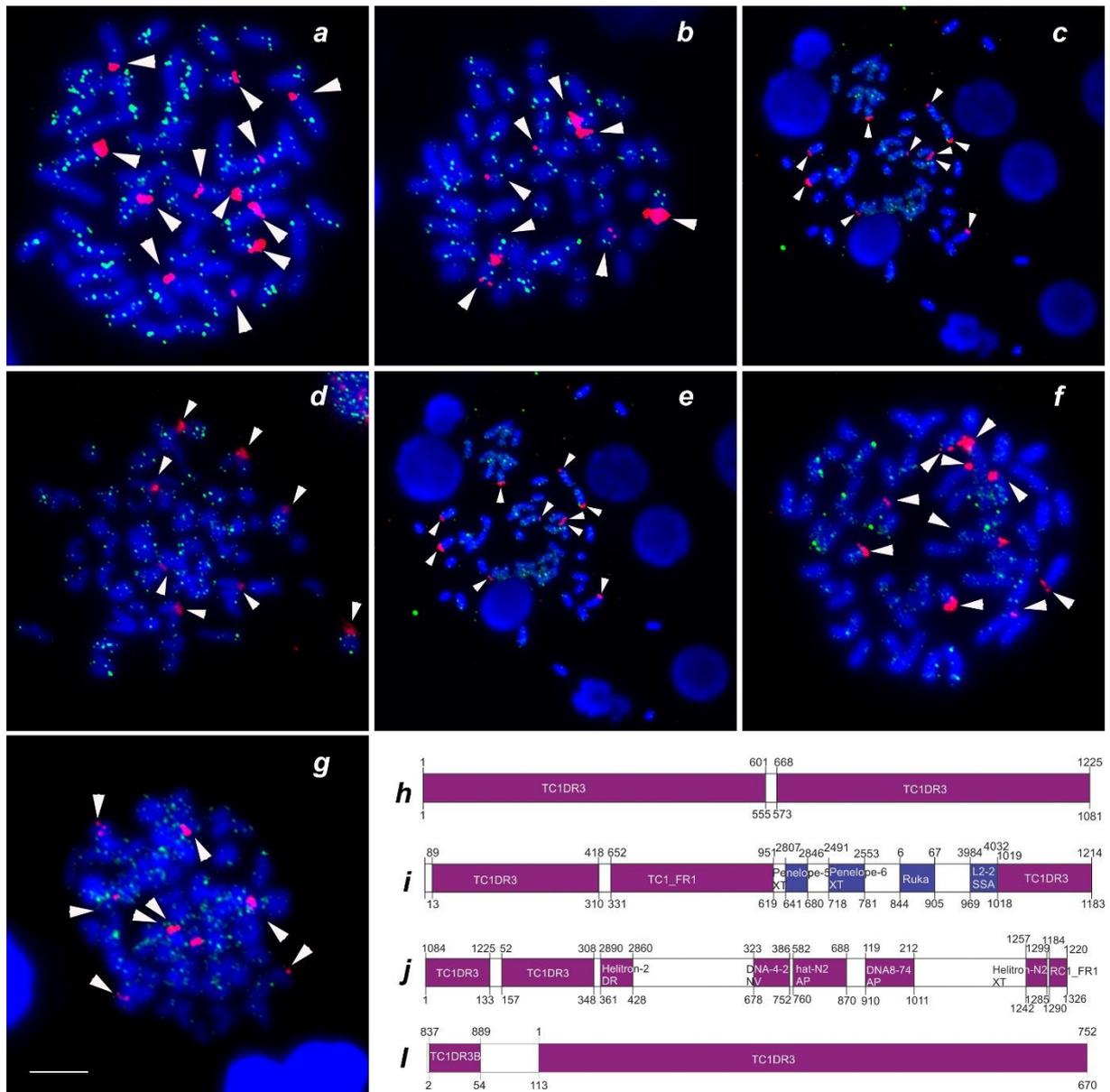


Figura 8. Metáfases mitóticas submetidas a FISH mostrando marcações de rDNA 5S, em vermelho, indicadas pelas cabeças de setas; e transposon *Tc-1 Mariner*, em verde, isolado do genoma de *R. latirostris* do rio Laranjinha. Em (a) *R. latirostris* do rio Laranjinha, (b) *R. latirostris* do rio Barra Grande, (c) *R. pentamaculata* rio Barra Grande (cariomorfo A), (d) *R. pentamaculata* do rio Barra Grande (cariomorfo B), (e) *R. pentamaculata* do rio Juruba, (f) *R. stellata* do rio Uruguai, (g) *R. capitonia* do rio Uruguai. Em (h), (i), (j) e (l), figuras esquemáticas das sequências do *Tc-1 Mariner* obtidas de *R. latirostris* (rio Laranjinha), *R. pentamaculata* (rio Juruba), *R. stellata* (rio Uruguai) e *R. capitonia* (rio Uruguai), respectivamente. Barra = 10 μm.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi identificado uma ampla variação do número diploide ($2n$) entre diferentes espécies de *Rineloricaria*: $2n = 46$ cromossomos para *R. latirostris* dos rios Laranjinha e Barra Grande; $2n = 56$ cromossomos para o cariomorfo A de *R. pentamaculata* dos rios Barra Grande e Juruba; $2n = 54$ cromossomos para o cariomorfo B de *R. pentamaculata* do rio Barra Grande; $2n = 54$ cromossomos para *R. stellata* e $2n = 64$ cromossomos para *R. capitonia*, ambas do rio Uruguai. Esta variação de $2n$ ocorre a partir de eventos Robertsonianos de fissão e fusão cêntrica.

Para o rio Barra Grande, os dois cariomorfos sintópicos de *Rineloricaria pentamaculata* não apresentam evidências de formação de híbridos e devem constituir unidades evolutivas independentes.

Pontos de fusão cromossômica nas espécies *R. latirostris* e *R. pentamaculata* (cariomorfo B) apresentam vestígios de sítios teloméricos intersticiais (ITS), indicando a fusão de acrocêntricos para formação de cromossomos metacêntricos e redução do $2n$.

Este estudo também apresenta evidências que sítios de rDNA 5S e rDNA 18S também podem estar envolvidos nos eventos de fusão cêntrica em *Rineloricaria*.

O elemento transponível *Tc-Mariner Like* obtido em *Rineloricaria* não pode ser correlacionado a dispersão do rDNA 5S, como já observado em espécies de *Gymnotus*.

A análise nucleotídica dos elementos *Tc-Mariner Like* de *Rineloricaria* evidenciou intensa degeneração molecular, presença de TEs compostos e não formação de ORFs para transposase. Estes resultados indicam a falta de atividade

TE para estas sequências, as quais devem permanecer inertes ou servir para outras funções genômicas.

Este estudo apresenta uma proposta de associação dos elementos transponíveis com os eventos Robertsonianos no gênero *Rineloricaria*. Até o momento, pode ser identificada a associação dos rDNAs como pontos quentes para quebras e fusões de cromossomos acrocêntricos neste grupo de peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUSAN, G; SZILAGYI A; ZHANG, Y; PAPP B Turning gold into 'junk' transposable elements utilize central proteins of cellular networks. **Nucleic Acids Research**, 41(5): 3190–3200, 2013.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO, H.F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: **Estudos ecológicos de comunidade de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, p. 374-400. p. 534. 1999.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v.5, p.57-63, 2003.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v.124, p.127-136, 2005.
- ALVES, L. A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9. 2006.
- AQUINO, A. E.; SCHAEFER, S. A.; MIQUELARENA, A. M. A new species of *Hisonotus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Upper Río Uruguay Basin. **American Museum Novitates**, v.3333, p.1–12. 2001.
- ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.141, p.1-80, 2004.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L.A.C. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**, v.134, p.201–210, 2001.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. A.; MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.19, p.393-401, 2009.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, p. 277-284, 2006.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v.49, p.81–90, 1996.

BERRA, T. M. Freshwater fish distribution. **Academic Press**. London, 2001.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, p.103-120, 1978.

BETANCUR-R, R.; ARTURO, A. P.; BERMINGHAM, E.; COOKE, R. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.45, p.339-357, 2007.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521–524, 2006.

BIET, E.; SUN, J.-S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 596-600, 1999.

BIFI, A. G.; PAVANELLI, C. S.; ZAWADZKI, C. H. Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguazu basin, Paraná State, Brazil. **Zootaxa**, v. 2275, p. 41-59, 2009.

BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; CARNEIRO, P. L. S.; DIAS, A. L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p. 933-943, 2012.

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

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Characterization of Armored Catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First Report of B Chromosomes in the Genus. **Zoological Science**, v. 29, p. 604-609. 2012b.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; BERTOLLO, L. A. C.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23(1), p.127-134, 2013.

BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v 16, p. 203-215. 2008.

BONETTO, A.A. **The Paraná river system**. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. The Ecology of River Systems. Springer, USA 1ed. p.541-545.p.793. 1986.

BOUNEAU, L.; FISHER, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; FROSCHAUER, A.; JAILLON, O.; COUTANCEAU, J; KÖRTING, C.; WEISSENBACH, J.; BERNOT, A.; VOLFF, J. An active non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**, v. 13, p 1686–1695, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**, 3.ed. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/visualizar_texto.cfm?idtxt=1689>. Acesso em: 17 jun. 2013
BRIGGS, J. C. The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. **Journal of Biogeography**, v. 32, n. 2, p. 287-294, 2005.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y. e ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF. p. 115, 1988.

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

BRUM, M.J.I.; GALETTI Jr., P.M. Teleostei Ground Plan Karyotype. **Journal of Comparative Biology**, v.2, p.91-102, 1997.

BUENO, V.; VENERE, P. C.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, 2014. doi. 10.1155/2014/943825

BUENO, V.; ZAWADZKI, C.H.; MARGARIDO, V.P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new

perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.

CAPY, P.; VITALIS, R.; LANGIN, T.; HIGUET, D.; BAZIN, C. Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n. 3, p. 359-368, 1996.

CARVALHO, T. P.; LEHMANN; REIS, R. E. *Gymnotocinclus anosteos*, a new uniquely-plated genus and species of loricariid catfish (Teleostei: Siluriformes) from the upper rio Tocantins basin, central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n.3, p. 329-338, 2008.

CARVALHO, T. P.; REIS, R. E. Four new species of *Hisonotus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Uruguay, southeastern South America, with a review of the genus in the rio Uruguay basin. **Zootaxa**, v.2113, p.1-40. 2009.

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. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.12(2), p. 429-438, 2014.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos casuais. In: Ecologia de peixes de riachos: Estado Atual e Perspectivas (E.P. Caramashi, R. Mazzoni, C.R.S.F. Bizerril, P.R. Peres-Neto, eds.). **Oecologia Brasiliensis**, v.6, p. 139-155, 1999.

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

CAVALIER-SMITH, T. Selfish DNA and the origin of introns. **Nature** v. 315, p. 283, 1985.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, n.3, p. 253-260, 2001.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.C.A.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of na XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Hartia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Citogenetic and Genome Research**. v.112, p. 320-324, 2006.

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

CHIACHIO, M.C; MONTOYA-BURGOS, J.L; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. **Relações filogenéticas em Hypoptopomatinae e Neoplecostominae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) baseadas em seqüências de DNA nuclear**. Resumos do 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

CRAMER, C.A; LIEDKE, A.M.R; BONATTO, S.L; REIS, R.E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bulletin of Fish Biology**, v.9, p. 51–59, 2008.

CUELLAR O, UYENO T. Triploidy in rainbow trout. **Cytogenetics**, v.11, p.508-515. 1972.

CURCIO, M. J.; DERBYSHIRE, K. M. The outs and ins of transposition: from Mu to kangaroo. **Molecular Cell Biology**, v.4, p. 865–877, 2003.

DA GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Eduem, 2007.

DA SILVA, C; HADJI, H; OZOUF-COSTAZ, C; NICAUD, S; JAILLON, O; WEISSENBRACH, J; CROLLIUS, H.R. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.99, p. 1636-1641, 2002.

DA SILVA, M.; MATOSO, D. A.; LUDWIG, L. A. M.; GOMES, E.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; & ARTONI, R. F. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v.91, p.361-366.2011a.

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

DE OLIVEIRA, R.R. **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica**. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2006

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. p. 279-330. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.603, 1998.

DEBONA, T.; ARSEGO, E.; dos SANTOS, V.V.; DAMASCENO, D.Z.; VIANNA N.C.; BAUMGARTNER, G. **Composição ictiofaunística do rio das Cinzas – bacia do rio Paranapanema, São Paulo, Brasil**. II Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca e XII Semana Acadêmica de Engenharia de Pesca, 2010. In: http://cac.php.unioeste.br/eventos/engenhariapesca/eventos/II_SINPESCA/Engenharia_de_Pesca/arquivo14.pdf, acesso em 15/12/2014.

DIMITRI, P.; JUNAKOVIC, N. Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. **Trends in Genetics**, v. 15, p. 123-124, 1999.

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

DRUMMOND, AJ; ASHTON, B; CHEUNG, M; HELED, J; KEARSE, M; MOIR, R et al. **Geneious v4.8.5**, Disponível em: <http://www.geneious.com>, 2009.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32 p.1792–1797, 2004

EICKBUSH, T. H.; FURANO, A. V. Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, p. 669–674, 2002.

ERRERO-PORTO, F.; DE ROSSI VIEIRA, M. M.; BARBOSA, L. M.; BORIN-CARVALHO, L. A.; VICARI, M. R.; DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. **Zebrafish**, v. 11(4), p. 318-324, 2014.

ERRERO-PORTO, F; PORTELA-CASTRO, A.L.B; MARTINS-SANTOS, I.C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyological Research**, v.58, p. 225–231, 2011.

ERRERO-PORTO, F.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; MARTINS-SANTOS, I.C. Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Parana River basin. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.3, p. 1654–1659, 2010.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species of Fishes by family/subfamily**. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>ByFamily.asp>, 2015.

ESTEVES, K. E.; ARANHA, J. M. R., CARAMASCHI, E. P., MAZZONI, R., & PERES-NETO, P. R. Ecologia trófica de peixes de riachos. **Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis**, v. 6, p. 157-182, 1999.

FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, p.161-166, 1991.

FERNÁNDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics**, 13:272, 2012.

FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 1-2, p. 64-70, 2010.

FERREIRA, D.C; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. A new dispersed element in the genome of the genome of the catfish *Hisonatus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopotinae). **Mobile Genetic Elements**, v.1-2, p. 103-106, 2011.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 5, p. 397-405, 2008.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetic**, v.41, p.331–368, 2007.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FINN, R. D.; MISTRY, J., TATE, J., COGGILL, P., HEGER, A., POLLINGTON, J. E. & BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl 1, p. D211-D222, 2010.

FINNEGAN, D.J. Transposable elements in eukaryotes. **International Review of Cytology**, v.93, p.281-326, 1985.

FISCHER, C; BOUNEAU, L.; COUTANCEAU, J. P.; WEISSENBAACH, J.; VOLFF, J. N.; OZOUF-COSTAZ, C. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**, v. 336, n. 2, p. 175-183, 2004.

FISCH-MULLER, S. Subfamily Ancistrinae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p**, p. 373-400, 2003.

FROESE, R.; PAULY, D. Editors. 2014. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version. 2014

GALVES, WANNER; SHIBATTA, OSCAR AKIO; JEREP, FERNANDO CAMARGO. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 141-154, 2009.

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

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertosiano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

GORNUNG, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: a review of research. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n.2-3, p. 90-102, 2013.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 154 p. 1988.

HADJIOLOV, A. A. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. In: **Cell Biology Monographs**. Ed. Springer-Verlag, v. 12, 263 pp., 1985.

HAHN, N.S.; PAVANELLI, C.S; OKADA, E.K. Dental development and ontogenetic diet shifts of *Roebooides paranensis* Pignalberi (Osteichthyes, Characinae) in pools of the Upper rio Paraná floodplain (state of Paraná, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 1, p. 93-99, 2000.

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

HERPIN, A; BRAASCH, I; KRAEUSSLING, M; SCHMIDT, CORNELIA; THOMA, EC; NAKAMURA, S; TANAKA M; SCHAT, M. Transcriptional Rewiring of the Sex Determining dmrt1 Gene Duplicate by Transposable Elements. **PLoS Genetics**, v. 6, 2, e1000844, 2010.

HURST, G.D.; WERREN, J.H. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 2(8), p.597-606, 2001.

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.17, 1991.

ISBRÜCKER, I.J.H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Verslagen en Technische Gegevens**. Universiteit van Amsterdam. v.22, p.1–181, 1980.

JURKA, J. Repeats in genomic DNA: mining and meaning. **Current Opinion Structural Biology**, v.8, p.333-337, 1998.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V., PAVLICEK, A., KLONOWSKI, P., KOHANY, O., & WALICHIEWICZ, J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 462-467, 2005.

KANTEK, D. L.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. M. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguaçú River (PR). **Folia Biologica**, v. 57, n.1-2, p. 37-41, 2009.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**, v.141, p.237-242, 2004.

KAVALCO, K.F; PAZZA, R; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v.94, p.180-186, 2005.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2001.

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

KOHANY, O., GENTLES, A. J., HANKUS, L., & JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 474, 2006.

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

LEGRANDE, W.H. Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, Noturus. **Copeia**, v.1, p.33-52, 1981.

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

LEWIN, B. Retrovirus and retroposons. In: **Genes VIII**. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ. p.493-509, 2004.

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

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

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Edusp, São Paulo. 1999.

LUCENA, C. A. S.; KULLANDER, S. O. The *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguai River drainage in Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.3, p. 97–160. 1992.

LUNDBERG, J. G.; FRIEL, J. P. Siluriformes. Catfishes. v. 20 January 2003 (under construction). 2003.

LUNDBERG, J.G. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. . In: MALABARBA, L.R. et al. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 49-68, p. 603. 1998.

MAACK, R. Os sistemas hidrográficos do Estado do Paraná. **Geografia física do Estado do Paraná**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1981.

MAIA, T. P. A.; GIULIANO-CAETANO, L; RODRIGUEZ, S. M; RUBERT, M; TAKAGUI, H. F; DIAS, L. A. Chromosomal banding in three species of the genus *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). **Ichthyological Research**, v.57, p. 209–213, 2010.

MALACRIDA, A.C.C.P., DIAS, A.L. & GIULIANO-CAETANO, L. Natural triploidy in *Astyanax* aff. *scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river bay-PR. **Cytologia**, v.68, p.267-270, 2003.

MARINO-RAMIREZ, L.; LEWIS, K. C.; LANDSMAN, D.; JORDAN, I. K. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.110, p.333–341, 2005.

MARIOTTO, S; CENTOFANTE, L; MIYAZAWA, S. C; BERTOLLO, C. A. L; MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p.595-600, 2009.

MARIOTTO, S; CENTOFANTE, L; VICARI, M.R; ARTONI, R.F; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v.5, p. 289-300, 2011.

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

MAXON, R.; COHN, R.; KEDES, L. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**, v. 17, p. 239–277, 1983.

MAZZUCHELLI, J; MARTINS, M. Genomic organization of repetitive DNAs in cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, v.136, p. 461-469, 2009.

MENDES-NETO, E. O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae)

from the Piunhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**, v.5, n.2, p. 133-142, 2011.

MENEZES, N.A. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* from Central and South America. In: VAZOLINI, P.E; HEYER, W.R. **Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p.295-304. p.488. 1988.

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

MERLO MA, CROSS I, MANCHADO M, CARDENAS S, REBORDINOS L: The 5S rDNA high dynamism in *Diplodus sargus* is a transposon-mediated mechanism. Comparison with other multigene families and Sparidae species. **Journal of Molecular Evolution**, v.76, p. 83–97. 2013.

MICHELLE, J.L; TAKAHASHI, C.S; FERRARI, I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). **Cytologia**, v.42, p.539–546, 1977.

MILANI, E. J.; ALMERIO, B. F.; SCHNEIDER, R. L. "Bacia do Paraná." **Boletim de Geociências da Petrobrás**, v.8.1, p.69-82.1994.

MILLER, W. J.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, v.100, p.261–270, 1997.

MIQUELARENA, A. M. & LÓPEZ, H. L. Considerations on the Ichthyofauna of the Uruguay River basin: *Hemiancistrus fuliginosus* Cardoso & Malabarba, 1999 (Loricariidae: Ancistrinae). **Journal of Applied Ichthyology**, v.20, p.238–240. 2004.

MOYLE, P.B; CECH Jr.,J.J. Fishes: An Introduction to Ichthyology. **Prentice-Hall**. 2000.

MUÑOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J.L. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. **Current Genomics**, v. 11, p. 115-128, 2010.

MUOTRI, A. R.; MARCHETTO, M. C.; COUFAL, N. G.; GAGE, F. H. The necessary junk: new functions for transposable elements. **Human Molecular Genetics**, v.16, n.2, p.R159–R167, 2007.

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

NELSON, J. S. Fishes of the world. **John Wiley and Sons, Inc.**, New York, USA. p. 162-170, 2006.

NOWAK, R. Mining treasures from “junk DNA”. **Science**, v. 263, p.608-610, 1994.

OCALEWICZ K. Telomeres in Fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 114–125, 2013.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome Formulae of Neotropical Freshwater Fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, p.577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A. E. A cytogenetic study of *Diplotnystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. **Caryologia**, v. 53, n. 1, p. 31-37, 2000.

OLIVEIRA, R.R. **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero Ancistrus (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

OLIVEIRA, S.G.; BAO, W.; MARTINS, C.; JURKA, J. Horizontal transfers of Mariner transposons between mammals and insects. **Mobile DNA**, v. 3, p. 14, 2012.

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

OZOUF-COSTAZ, C; BRANDT, J., KOERTING, C. O. R. N. E. L. I. A., PISANO, E., BONILLO, C., COUTANCEAU, J. P., & VOLFF, J. N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, n. 01, p. 51-57, 2004.

PEREIRA, M.C.B.; SCROCCARO, J.L. **Bacias hidrográficas do Paraná**. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA, 2013. In: http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/corh/serie_historica_bacias_hidrograficas_2013.pdf, acesso em 22/12/2014.

PERRY, J. O.; SLATER, H. R.; CHOO, K. H. A. Centric fission - simple and complex mechanisms. **Chromosome Research**, v.12, p.627–640, 2004.

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

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

PIRIYAPONGSA, J.; MARINO-RAMIREZ, L.; JORDAN, I. K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. **Genetics**, v. 176, p. 1323–1337, 2007.

PLASTERK, RONALD HA, ZSUZSANNA IZSVÁK, AND ZOLTÁN IVICS. Resident aliens: the Tc1mariner superfamily of transposable elements." **Trends in Genetics**, v.15.8: p.326-332. 1999.

POLAVARAPU, N.; MARINO-RAMIREZ, L.; LANDSMAN, D.; MCDONALD, J. F.; JORDAN, I. K. Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA. **BMC Genomics**, v. 9, p. 226, 2008.

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

PONS, J.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E. Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. **Chromosome Research**, v.10, n.7, p. 597-606, 2002.

RAIO, C. B.; BENNEMANN, S.T. A ictiofauna da bacia do rio Tibagi e o projeto de construção da UHE Mauá, Paraná, Brasil. **Semina**, v. 31, p. 15-20, 2010.

REBORDINOS, L.; CROSS I.; MERLO, A. High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 1-11, 2013.

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.A.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.147, p. 277–299, 2006.

REIS., R. E., R. P. VARI, Z. M. LUCENA & C. A. S. LUCENA (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.603, 1998.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.

- RICAN, O.; KULLANDER, S. O. Character- and tree based delimitation of species in the '*Cichlasoma*' *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 44, p.1–17. 2006.
- RICAN, O.; KULLANDER, S. O. The *Austroloheros* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguay and Paraná River drainages, **Zootaxa**, v.1724, p.1–51. 2008.
- ROBERTSON, H. M.; LAMPE, D. J. Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 850-862, 1995.
- ROBERTSON, H.M. The Tc1-mariner superfamily of transposons in animals. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.99–105. 1995
- RODILES-HERNÁNDEZ, R. D. A; HENDRICKSON, J. G; LUNDBERG; HUMPHRIES, J.M. *Lacantunia enigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. **Zootaxa**, v.1000, p.1–24, 2005.
- RODRIGUES, R.M; ALMEIDA–TOLEDO, L.F. **Estudo comparativo citogenético-molecular em espécies do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraíba do Sul (RJ) e Nhundiaquara (PR)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. Resumos. Salvador: SBG,2008.
- ROSA, K.O; ZIEMNICZAK, K; BARROS, A.V; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; CESTARI, M.M; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, n.3, p. 739-749, 2012.
- SCHAEFER S.A; LAUDER G.V. Historical transformation of functional design: evolutionary morphology of feeding mechanisms in loricarioid catfishes. **Systematic Zoology**, v.35, p. 489–508, 1986.
- SCHAEFER, S.A. Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v.142, p. 167–210, 1990.
- SCHEMBERGER, M. O. **Estudos evolutivos envolvendo DNAs repetitivos e cromossomos sexuais em espécies da família Parodontidae (Pisces; Characiformes)**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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

SCHEMBERGER, M. O.; OLIVEIRA, J. I. N.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Construction and Characterization of a Repetitive DNA Library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A Genomic and Evolutionary Approach to the Degeneration of the W Sex Chromosome. **Zebrafish** v. 11, n.6, p. 518-527, 2014.

SCZEPANSKI, T. S.; VICARI, M. R.; DE ALMEIDA, M. C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R. F. Chromosomal Organization of Repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n.4, p. 309-316, 2013.

SHAMPAY, J.; SCHMITT, M.; BASSHAM, S. A novel minisatellite at a cloned hamster telomere. **Chromosoma**, v.104, p.29-38, 1995.

SHAPIRO, J. A.; VON STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biology Reviews**, v. 80, p. 227–250, 2005.

SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L; BENNEMANN, S.T; SILVA-SOUZA, A.T. **Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi**. In: (Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A; eds.) A bacia do rio Tibagi. Londrina: M.E. 2002.

SHIBATTA, O.K; GEALH, A.M; BENNEMANN, S.T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, p.1-10, 2007.

SINZELLE, L.; IZSVAK, Z.; IVICS, Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 1073-1093, 2009.

SLIJEPCEVIC, P. Telomerase and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chomosome**, v.107, p.136-140, 1998.

SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature**, v.8, p.272-285, 2007.

SMIT AFA, HUBLEY R, GREEN P: **RepeatMasker Open-3.0**. Disponível em: <<http://www.repeatmasker.org>> Acessado em: 30/06/2014.

SMIT, A.F.A. Initial survey of interspersed repeats in *Takifugu rubripes*. **Rebase Reports** 2, v.1, p. 54, 2002.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed, 2001

STOLF, R.; SWARCA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil. **Caryologia**, v. 57, n. 4, p. 348-352, 2004.

SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. Malden, **Blackwell Publishing**, New York, USA, 2003.

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

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, S.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B. O.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; TÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BCM Evolutionary Biology**, v. 13, n.42, p. 1-11, 2013.

TAKAGUI, F. H.; VENTURELLI, N. B.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C.; VICARI, M. R.; FENOCCHIO, A. S.; GIULIANO-CAETANO, L. The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic Diversification of the Species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. **Zebrafish**, v. 11, p. 300-305, 2014.

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

TEUGELS, G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an over-view. **Aquatic Living Resources**, v. 9, p.9-34, 1996.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, n.22, p. 5955-5959, 2002.

VIANNA, N.C.; NOGUEIRA, M.G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 20, n.2, p. 117-130, 2008.

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

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 173-179, 2008.

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

VOLFF, J. N.; KORTING, C.; FROSCHAUER, A.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular and Evolution**, v. 52, p. 351–360, 2001.

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

WESSLER, S.; BUREAU, T. E.; WHITE, S. E. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.5, p.814–821. 1995

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p.973–982, 2007.

WINBERGER P. H.; REIS, R. E.; THORNTON, K. R. **Mitochondrial Phylogenetics, Biogeography, and Evolution of Parental Care and Mating Systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae)**. In: L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, C. A. S. Lucena, and Z. M. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. **Edipucrs**, Porto Alegre, p.509–518. 1998.

ZANIBONI FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce**. In: Poli C.R. Poli A.T.B.; Littlepage J.; Summers P. *Aqüicultura: o registro da experiência brasileira*. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 337-369. 2003

ZAWADZKI, C. H; WEBER, C; PAVANELLI, C. S. A new darksaddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v.8, p. 719-725, 2010.

ZIEMNICZAK, K. **Estudos citogenéticos em espécies de Loricariidae (Pisces, Siluriformes) das nascentes dos rios Ribeira e Tibagi, Ponta Grossa-PR.** Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, 2011, 84p.

ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A.V.; ROSA, K.O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; CESTARI, M.M.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, p. 492-501, 2012.

7. ANEXOS

Anexo 1- Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa



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

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 007/2014

Protocolo UEPG – 2787/2014

Título – “Projeto de pesquisa Isolamento, localização in situ e expressão gênica de DNAs repetitivos em Loricariidae (Pisces, Siluriformes)”. **Interessada** – *Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari*

Data de Entrada – 21/02/2014

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 21/02/2014 a 20/02/2016

Considerações

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 30 (trinta) peixes.

- APROVADO.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Maria Marta Loddi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Anexo 2- Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/ IBAMA/**SISBIO: 15117-1**

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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 61434795

Página 1/2

Anexo 3- Obtenção de Cromossomos Mitóticos via cultura curta (FENOCCHIO et al., 1991)

A obtenção de cromossomos mitóticos por cultura curta consiste em anestésiar o exemplar colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 6 ml de meio de cultura RPMI dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha. Após, adicionar 100 µl de uma solução aquosa de colchicina 0,025% e aguardar 50 - 60 minutos. Em seguida, centrifugar durante 10 minutos, a 1000 rpm.

Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e adicionar 6 ml da solução hipotônica (KCl 0.075M), homogeneizar e incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos. Após, acrescentar 1 ml de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes. Centrifugar durante 10 minutos, a 1000 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 1000 rpm. Repetir o último passo. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material. Acondicionar em microtubos, podendo ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

Anexo 4- Obtenção de Cromossomos Mitóticos via cultura de campo (BLANCO et al., 2012a)

Este método consiste em iniciar a preparação cromossômica logo após a captura dos animais no campo. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal e manter o espécime vivo por 45 – 50 min. Anestésiar o exemplar colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 6 ml da solução

hipotônica (KCl 0.075M), dissociar as células com uma seringa desprovida de agulha, homogeneizar e incubar em temperatura ambiente durante 30 minutos. Após, acrescentar 2 ml de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes. Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, com os tubos mantidos em refrigeração até o acesso ao laboratório (até 168h). No laboratório, homogeneizar e centrifugar durante 10 minutos, a 1000 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 1000 rpm. Repetir o último passo. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material. Acondicionar em microtubos, podendo ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

Anexo 5-Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandamento-C (SUMNER, 1972).

As lâminas contendo o material celular devem ser tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 10 minutos, lavando-se com água destilada logo em seguida. Posteriormente incuba-se a preparação em hidróxido de Bário (Ba(OH)₂) a 5%, recém preparada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos. Por fim lavar bem, com água destilada, secar ao ar e corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo 6 - Extração de DNA método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980)

Foi adicionado em um tubo 0,2 gramas de fígado juntamente com 600 µl de tampão CTAB (concentração final: 2 % de CTAB; 1 M de NaCl; 0,1 M EDTA; 0,1 M Tris-HCl pH8), 13 µl de proteinase K (100mg/ml) e 5 µl de β-mercaptoetanol. Incubar a 60 °C por 10h ou até o tecido ser totalmente digerido. Depois foi adicionado 10 µl de RNase (10mg/ml) e o material é submetido a uma temperatura de 37 °C por 3h. Foi adicionado 600 µl de clorofórmio e homogeneizado suavemente durante 5 min. O material foi então submetido a uma centrifugação por 15 min. a 8000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo, 600 µL de etanol absoluto é adicionado sobre o material e deixado a -20 °C por 2h ou *overnight*. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 15 min. e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol 70 % e centrifugado novamente a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi retirado, e o tubo com o DNA foi deixado secando na estufa a 37 °C e depois ressuspendido em 50 µl de TE.

Anexo 7 - Obtenção da sequência telomérica geral dos vertebrados TTAGGGn (IJDO et al., 1991)

Para a amplificação da sonda telomérica foi utilizada a seguinte reação (tampão *Taq* polimerase 1 X = 2 mM MgCl₂, 40 µM dNTPs, 0,2 µM primer (TTAGGG)₆, 0,2 µM primer (AATCCC)₆ e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes especificações: duas condições de amplificação, a primeira amplificação é realizada com baixa estringência: 4 min a 94°; 10 ciclos de (1 min. a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min. e 30s a 72 °C), seguidos por 30 ciclos de alta estringência (1 min. a 94 °C, 30s a 60 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C) e 5 min a 72 °C.

Anexo 8 - Obtenção do TE Tc1-Mariner

A reação de PCR para obtenção da sequência do TE *Tc1-Mariner* a partir do DNA genômico foi realizada com (20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 2 μM dNTP, 1 μM primer Mariner – único e 2 U de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 5 min. a 94 °C; 35 ciclos: 1 min. a 90 °C, 1 min. e 30 s a 57 °C e 1 min. e 30 s a 72 °C.

Anexo 9 – Ligação em vetor plasmidial pGEM[®]-T(Promega)

Em um tubo de 1,5 mL, adicionar 5uL de buffer de ligação 2x, 1 uL do vetor pGEM-T (~60 ng), aproximadamente 180 ng de inserto, 1uL de T4 DNA Ligase e água suficiente para completar a reação para um volume final de 10 uL. Misturar os reagentes e deixar por 16h em geladeira (4°C)

Anexo 10 – Transformação em bactéria competente

Retirar bactéria competente do -80°C e deixar em gelo. Adicionar 1-10 μl de plasmídeo (fechado ou produto de ligação) à bactéria competente e deixar em banho-maria 42°C por 90 segundos. Deixar 1 minuto no gelo. Adicionar 800 μl de LB líquido (sem antibiótico) e deixar por 1 hora a 37°C (em forno de hibridação ou em estufa).

Plaqueamento: fazer placas com 20 ml de ágar + antibiótico de interesse. Ao se utilizar plasmídeos que permitam diferenciação de colônias azul/branco, utilizando a alça de Drigalsky, espalhar sobre a placa 50 μl de IPTG (200 mM) e 40 μl de X-GAL

(0,2%). Esperar 20 minutos até plaquear. Centrifugar a cultura por 2 minutos a 5000 rpm, descartar 800 µl de meio e mexer para dissolver o pellet formado (não usar pipeta). Espalhar sobre a placa. Deixar placa na estufa 37°C overnight (deixar placa virada de cabeça pra baixo). Crescidas as colônias bacterianas, vedar as placas com parafilm e deixá-las na geladeira 4°C (deixar placa virada de cabeça pra baixo).

Anexo 11 – Reação de mini preparação plasmidial (kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare)

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

Anexo 12-Marcação de sondas por nick translation kit Biotin-Nick Translation

Mix (Roche Applied Science)

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

Anexo 13-Marcação de sondas por nick translation kit Dig-Nick Translation Mix (Roche Applied Science)

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

Anexo 14- Marcação de sondas por PCR

A sondas repetitivas utilizadas neste estudo foram marcadas também pelo método de PCR usando biotina-16-dUTP (Roche Applied Science). O PCR marcado com primers específicos foi realizado para o rDNA usando 20 ng de molde de DNA, 1X *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μ M de dATP, dGTP e dCTP, 28 μ M de dTTP, 12 μ M biotina-16-dUTP, 1 μ M de *primers*, 2mM MgCl₂ e 0.05 U/ μ L de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).

Anexo 15-Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

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

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo *overnight* a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas em *Tween* 20, por 5 minutos; incubação em tampão NFDM/Anti-digoxi rodamina ou NFDM/Estreptavidina a 5%, por 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em *Tween* 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “*antifade*” (Fluka).