

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

Citogenética Clássica e Molecular em peixes neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio.

Elisangela Bellafronte da Silva

SÃO CARLOS - SP
2009

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

Citogenética Clássica e Molecular em peixes neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio.

Elisangela Bellafronte da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução

SÃO CARLOS - SP
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586cc

Silva, Elisangela Bellafronte da.

Citogenética clássica e molecular em peixes neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio / Elisangela Bellafronte da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 125 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Citogenética. 2. Transposição de águas - Piumhi, Rio. 3. Espécies invasoras. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

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

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM PEIXES
NEOTROPICAIS. ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE BACIAS
HIDROGRÁFICAS COM ÊNFASE EM REGIÃO DE
TRANSPOSIÇÃO DE RIO.**

Tese de Doutorado de Elisangela Bellafronte da Silva

Banca Examinadora

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari



Profa. Dra. Carla Simone Pavanelli



Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba



Prof. Dr. Paulo César Venere



Orientador

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Co-orientador

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Dedico esta tese aos meu pais

Elizio e Rosângela

**“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades.
Lembrai-vos de que as grandes coisas do
homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”**

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, meu “pai” e orientador, que sempre confiou na minha capacidade e me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Ao Prof. Dr. Vladimir pela co orientação.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

Ao IEF/MG (Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais) e ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais) pelas autorizações e suporte nas coletas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro para desenvolvimento do projeto.

Aos amigos dos laboratórios de Biodiversidade Molecular e Citogenética: Daniel, Roberto, Marcello, Sandra, Marceléia, Josiane, Juliana, Wellington, Daniel Kantec, Lívia, Ana Karina, Michelle, Luis Fernando, Fernando “Testa”, Artur, Allyson, Renata, Bruno, Carla, Maurício, Perla Thatiana, Margarita, Marina, Marcelo Cervini, Marcelo Vicari, Ana Cristina e Aline.

Ao Pedro Gallo e Luiz Henrique pelo auxílio laboratorial e coletas, e ao Jorjão pela consideração e inúmeros favores prestados.

Aos professores Luis Antônio Carlos Bertollo e Pedro Manuel Galetti,
por representarem grandes exemplos como profissionais.

À minha mais recente família: Adriana, Aristeu e Bruno.

Ao Vítor, meu namorado e melhor amigo... amo você!

Aos meus queridos pais, Elizio e Rosângela, por estarem sempre ao meu
lado.

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1 - Localização do rio Piumhi, no estado de Minas Gerais, Brasil. _____9

Figura 2 - Dique de Capitólio separando as águas do rio Grande (lado esquerdo) e as águas do rio Piumhi (lado direito) _____11

Figura 3 - Hidrografia da região de transposição do rio Piumhi, mostrando em (a) antes de 1963 e (b) depois de 1963 _____11

Figura 4 - Hidrografia da região anterior à transposição do rio Piumhi, evidenciando o antigo Pantanal ali existente e alguns tributários dos rios São Francisco e Piumhi: (a) Córrego da Mamona; (b) Córrego do Bálamo; (c) Córrego do Varador; (d) Ribeirão dos Almeidas; (e) Córrego Capão da Olaria; (f) Pantanal do Cururu _____14

Figura 5 - Diferenças na estrutura bucal em *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon* _____23

Materiais e Metodologia

Figura 6 - Locais de coleta _____35

Figura 7 - Espécies coletadas de Parodontidae: (a) *Apareiodon piracicabae*, (b) *Apareiodon ibitiensis*, (c) *Parodon nasus*, (d) *Parodon hilarii*, (e) *Apareiodon affinis* _____36

Figura 8 - Espécies de Gymnotiformes coletados: (a) *Gymnotus sylvius* e *Eigenmannia virescens* (b) citótipo A e (c) citótipo B _____37

Figura 9 - Ribeirão Araras, MG _____38

Figura 10 - Cachoeira do rio Piumhi. A nascente do rio Piumhi se localiza acima da cachoeira _____38

Figura 11 - Rio Passa-Cinco, SP _____ 39

Figura 12 - Rio Mogi-Guaçu, SP _____ 39

Figura 13 - Ribeirão Minhoca, MG _____ 40

Capítulo 1

Figura 1 - - Locais de coleta de *Apareiodon ibitiensis*: (A) Riacho Frio e (B) Ribeirão Araras (Bacia do rio São Francisco) e (C) rio Passa Cinco (Bacia do Alto rio Paraná). (D) *Apareiodon* SP. Foi coletado no rio Verde (Alto rio Tibagi) (Vicari et al 2006). _____ 67

Figura 2 - Cariótipos de machos de *Apareiodon ibitiensis* corados por Giemsa (a, c, e) e C bandado (b, d, f). (a, b) cariótipos da população do riacho Frio. (c, d) cariótipos da população do ribeirão Araras. (e, f) cariótipos da população do rio Passa Cinco. Bar = 10 μ m. _____ 68

Figura 3 - Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* corados por Giemsa (a, c, e) e C bandados (b, d, f). (a, b) cariótipos da população do riacho Frio. (c, d) cariótipos da população do ribeirão Araras. (e, f) cariótipos da população do rio Passa Cinco. Bar = 10 μ m. _____ 69

Figura 4 - Marcadores cromossômicos em *Apareiodon ibitiensis*. (a) Representa o cariótipo das populações da bacia do rio São Francisco mostrando quatro sítios de DNAr 18S. (b) Cariótipo do rio Passa Cinco, bacia do Alto Paraná mostrando oito sítios de DNAr 18S. (c) Representa o cariótipo de *A. ibitiensis* mostrando o sítio de DNAr 5S no par cromossômico 9. (d, e) Impregnação por Ag-RON na bacia do rio São Francisco e Alto Paraná respectivamente. (f, g) cromomicina A3 na bacia do rio São Francisco e Alto Paraná respectivamente. Bar = 10. _____ 70

Capítulo 2

Figura 1 - Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos ao bandamento-C: em (a) macho de *A. affinis*, em destaque os cromossomos sexuais ZW_1W_2 das fêmeas; em (b) macho de *A. ibitiensis*; em destaque par sexual ZW das fêmeas; em (c) cariótipo

homomórfico representativo de *A. piracicabae* e; (d) cariótipo homomórfico representativo de *A. vittatus*. Barra= 5 μm _____86

Figura 2 - Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos a FISH para localização dos sítios de rDNA: em (a) cariótipo de exemplar macho de *A. affinis* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (b) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S; em (c) cariótipo de exemplar macho de *A. ibitiensis* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (d) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S para a população de *A. ibitiensis* do rio São Francisco; em (e) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S para a população de *A. ibitiensis* do alto rio Paraná; (f) cariótipo de exemplar macho de *A. piracicabae* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (g) destaque para o par portador das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S; em (h) cariótipo de exemplar fêmea de *A. vittatus* submetido a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho); (i) variação do número de sítios de rDNA 18S em *A. vittatus* e; em (j) cariótipo de exemplar fêmea de *P. pongoensis* submetido a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Barra= 5 μm ._____87

Figura 3 - Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos a FISH com sonda do DNA satélite pPh2004: em (a) cariótipo de exemplar fêmea de *A. affinis* evidenciando sítios pPh2004 nos pares 2 e 14; em (b) cariótipo de exemplar macho de *P. nasus* mostrando sítios pPh2004 nos pares 6, 13, 26 e 27 e; em (c) exemplar fêmea de *P. pongoensis* evidenciando o par 13 com sítios de DNA satélite pPh2004. Barra= 5 μm ._____89

Figura 4 - Idiogramas representativos dos marcadores cromossômicos de número/fórmula cromossômica, presença/ausência de cromossomos sexuais, heterocromatina constitutiva (preto), sítios de rDNA 5S (vermelho); sítios de rDNA 18S (verde) e, sítios do DNA satélite pPh2004 nas espécies da família Parodontidae. Em (a) fêmea de *A. affinis* evidenciando a situação heteromórfica para os cromossomos sexuais ZW_1W_2 ; (b) fêmea de *A. ibitiensis* (Ribeirão Araras -MG) mostrando o par sexual ZW; (c) variação dos cromossomos com sítios adicionais de rDNA 18S em *A. ibitiensis* (rio Passa Cinco - SP); (d) fêmea de *Apareiodon* sp. evidenciando o par ZW; (e) fêmea de *A.*

vladii evidenciando o par ZW; (f) situação homomórfica de *A. piracicabae*; (g) situação homomórfica de *A. vittatus*; (h) variação interindividual de sítios de rDNA 18S em *A. vittatus*; (i) fêmea de *P. moreirai* evidenciando o par sexual ZW; (j) fêmea de *P. hilarii* evidenciando o par sexual ZW; (l) situação homomórfica de *P. nasus*; (m) situação homomórfica de *P. pongoensis*. _____89

Capítulo 3

Figura 1 - Mapa do Brasil ressaltando as grandes bacias hidrográficas do sistema Paraná e São Francisco, e no detalhe a área de transposição do rio Piumhi. Os símbolos representam as espécies coletadas: triângulo para *Parodon nasus*; círculo para *Parodon hilarii*; losango para *A. ibitiensis*; quadrado para *A. piracicabae*; estrela de quatro pontas cheia para *Eigenmannia virescens* cariomorfo A; estrela de quatro pontas vazia para *Eigenmannia virescens* cariomorfo B e estrela de cinco pontas para *G. sylvius*. _____102

Figura 2 - Cariótipos de *P. nasus*, *P. hilarii*, *Apareiodon ibitiensis* e *A. piracicabae* corados com Giemsa. Nos respectivos box estão representados as AgRONS _____103

Figura 3 - Cariótipos de *Eigenmannia virescens* cariomorfo A, *E. virescens* cariomorfo B evidenciando os cromossomos sexuais Z e W, e *Gymnotus sylvius*. Nos respectivos box estão representados as AgRONS. _____104

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	1
I - Espécies Invasoras	1
I.1 - Invasões de Peixes	3
II – Conexões Entre Bacias Hidrográficas	6
II.1 - Transposição do Rio Piumhi	7
II.1.1 - A transposição	9
II.1.2 - Impactos causados pela transposição	12
II.1.3 - O Pantanal do rio Piumhi	12
III - Os Characiformes	12
III.1 - Família Parodontidae	16
IV- Os Gymnotiformes	24
IV.1 - Família Gymnotidae	26
IV.2 - Família Stenopygidae	27
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	29
MATERIAL	32
I- Espécies analisadas e locais de coleta	32
METODOLOGIA	41
I - Preparação de cromossomos mitóticos	41
I.1 - Técnica de suspensão celular - preparação direta <i>in vivo</i> (Bertollo et al 1978)	42
I.2 - Técnica alternativa - preparação <i>in vitro</i> (Moreira-Filho & Bertollo 1990)	43
I.3 - Técnica alternativa - preparação <i>in vitro</i> (Gold et al 1990)	43
II- Indução de aumento do número de mitoses	44
II.1 - Suspensão de levedura (Lee & Elder 1980)	44
III - Preparo de lâminas	44
IV - Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (Howell & Black 1980)	45
V - Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972)	45

VI- Coloração cromossômica com fluorocromo Cromomicina A ₃ + Distamicina A (Schmid 1980)	46
VII - Técnica de localização cromossômica de genes ribossômicos 18S, 5S e DNA satélite Pph2004 por hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH) (Pinkel et al 1986) com algumas modificações	47
VIII - Estudos cariotípicos	51
RESULTADOS	53
Capítulo 1 - Cromossomos sexuais ZZ/ZW diferenciados em <i>Apareiodon ibitiensis</i> (Teleostei, Parodontidae): Citotaxonomia e biogeografi	53
Capítulo 2 - Marcadores cromossômicos e inferências filogenéticas entre os Parodontidae	71
Capítulo 3 - Identificação de espécies de peixes invasoras em decorrência de conexões entre bacias hidrográficas. Contribuição citogenética.	91
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

RESUMO

Estudos citogenéticos básicos e moleculares foram realizados em algumas espécies de peixes da família Parodontidae: *Apareiodon ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. affinis*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp. *Parodon nasus* e *Parodon hilarii* coletados em distintas bacias hidrográficas, com ênfase em uma área de transposição de rio - o rio Piumhi. *Apareiodon. ibitiensis* do alto Paraná e *Apareiodon* sp. A do São Francisco apresentaram as mesmas características cromossômicas, assim como *A. piracicabae* em relação à *Apareiodon* sp. B. A presença de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW foi verificado em *A. ibitiensis* e em *Apareiodon* sp. , onde a presença da heterocromatina que originou o cromossomo W foi identificada pelo bandamento C corado com Iodeto de Propídio. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com DNAs ribossômicos 18S e 5S foram realizadas em *A. affinis*, *A. piracicabae* e *A. ibitiensis*, resultando em apenas um par cromossômico marcado com DNAr 5S nas três espécies, todos em pares cromossômicos distintos. O DNAr 18S também está presente em um par em *A. affinis* e *A. piracicabae*, mas apresentou-se polimórfico entre populações de *A. ibitiensis*. Enquanto o DNAr 18 se encontra mais conservado nas espécies de Parodontidae, o DNAr 5S pode ser considerado um caráter citotaxonômico para o grupo. FISH com DNA satélite pPh2004 isolado de *P. hilarii* também foi realizado em *A. piracicabae*, *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. affinis*, *Apareiodon* sp. e *P. nasus*, mas marcações foram encontradas apenas em *P. nasus*. e *A. affinis*. Quando comparado as outras espécies onde o FISH com pPh2004 foi feito, dois agrupamentos são formados: 1) a presença deste DNA em todas espécies do gênero *Parodon* e 2) a ausência em quase a totalidade das espécies analisadas do gênero *Apareiodon*, sugerindo a manutenção destes gêneros. Após a caracterização cromossômica e confirmação das espécies

Apareiodon ibitiensis, *Apareiodon piracicabae*, além de *Parodon nasus* em distintas localidades da bacia do rio São Francisco (regiões de Três Marias e de transposição do rio Piumhi), foi possível fazer um rastreamento citogenético das espécies de Parodontidae nesta bacia hidrográfica, que pode ser justificada através de conexões naturais (Pantanal do Piumhi) e antrópicas (transposição do rio Piumhi) entre as bacias do alto rio Paraná e do rio São Francisco. Além dos Parodontidae, espécies de Gymnotiformes - *Eigenamnnia virescens* e *Gymnotus sylvius* também descritas para a bacia do alto Paraná encontraram-se distribuídas na bacia do São Francisco, no qual a transferência deve ter ocorrido pelo Pantanal ou pela transposição. Análises citogenéticas com um maior número de ferramentas na família Parodontidae foi importante para uma melhor compreensão da evolução deste grupo de peixes, além de ter sido uma importante ferramenta na comparação de espécies alopátricas de Parodontidae, Gymnotidae e Sternopigydae presentes nas bacias do alto Paraná e São Francisco.

Abstract

Basic and molecular cytogenetic studies were carried out in a few fish species from family Parodontidae: *Apareiodon ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. affinis*, *A. vladii*, *Apareiodon* sp. *Parodon nasus* and *Parodon hilarii*. All were collected in distinct hydrographic basins, with emphasis in a river transposition area, more specifically of the Piumhi River. *Apareiodon. ibitiensis* from the Upper Paraná River and *Apareiodon* sp. A from the São Francisco River presented the same chromosomal characteristics, as also observed in *A. piracicabae* in relation to *Apareiodon* sp. B. The presence of simple sex chromosomes of the ZZ/ZW type was verified in *A. ibitiensis* and *Apareiodon* sp., where the presence of the heterochromatin that originated the W chromosome was identified through C-band staining with propidium iodide. Fluorescent *in situ* hybridizations (FISH) with 18S and 5S ribosomal DNAs were performed in *A. affinis*, *A. piracicabae* and *A. ibitiensis*, resulting in a single chromosome pair marked with 5S rDNA in the three species, all in distinct chromosome pairs. The 18S rDNA is also present in one pair in *A. affinis* and *A. piracicabae*, but was polymeric among *A. ibitiensis* populations. While the 18S rDNA is more conserved in the Parodontidae species, the 5S rDNA may be considered a cytotaxonomical character for the group. FISH with pPh2004 satellite DNA isolated from *P. hilarii* was also performed in *A. piracicabae*, *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. affinis*, *Apareiodon* sp. and *P. nasus*, but markings were only found in *P. nasus*. and *A. affinis*. When compared to other species where FISH with pPh2004 was carried out, two groups form: 1) the presence of this DNA in all the *Parodon* species, and 2) the absence in almost of the analyzed *Apareiodon* species, suggesting the maintenance of these genera. After the chromosomal characterization and confirmation of the species

Apareiodon ibitiensis and *Apareiodon piracicabae*, besides *Parodon nasus* in distinct localities of the São Francisco River basin (regions of the Três Marias and the Piumhi River transposition), a cytogenetic tracking of the Parodontidae species in this hydrographic basin was made possible, which can be justified through natural (Piumhi Pantanal) and anthropogenic (Piumhi River transposition) connections between the Upper Paraná and the São Francisco River basins. Besides the Parodontidae species, Gymnotiformes species (*Eigenamnnia virescens* and *Gymnotus sylvius*) also described for the Upper Paraná basin are distributed in the São Francisco basin, and the transfer probably occurred through the Pantanal or the transposition. Cytogenetic analyses with a larger number of tools in the family Parodontidae was important for a better understanding of the evolution of this fish group, besides having been an important tool in the comparison of allopatric Parodontidae, Gymnotidae and Sternopigyidae species present in the Upper Paraná and São Francisco River basins.

INTRODUÇÃO

I - Espécies Invasoras

Espécie invasora consiste em um termo com várias definições. Para sua designação são utilizados termos tais como: i) espécies não indígenas (ENI), ii) alienígenas, iii) não nativas, iv) estrangeiras, v) exóticas, vi) transplantadas, e vii) alóctones. Entretanto, dependendo da zona geográfica de origem da espécie, dois tipos de termos são reconhecidos: exótico, para designar os organismos provenientes de outro país, e transplantado (Fuller et al 1999) ou alóctone (Agostinho & Júlio Jr 1996), que se refere aos organismos deslocados de sua zona geográfica nativa, dentro do mesmo país (Shafland & Lewis 1984, Fuller et al 1999, Richardson et al 2000). Dependendo do autor, este termo pode ter uma conotação ambígua, relacionando-se tanto aos impactos causados pela espécie como pela sua dispersão e estabelecimento no novo ambiente. Esta falta de consenso faz com que este termo seja confuso e de difícil interpretação (Espínola & Júlio Jr 2007).

Para que os organismos invasores se adaptem ao novo ambiente, se estabeleçam e, algumas vezes, desloquem espécies nativas, devem ser consideradas tanto as características das espécies invasoras que as tornam bem sucedidas, como as

características dos ambientes invadidos, suscetíveis ao estabelecimento (Espínola & Júlio Jr 2007, Hayes & Barry 2008).

Estudos revelam que espécies invasoras podem ser diferenciadas de espécies nativas apenas por suas características (Kolar & Lodge 2001), assim como outras espécies compartilham um subconjunto de características invasoras com as espécies nativas, indicando que a invasão envolve interações complexas, dificilmente categorizadas (Thebaud et al 1996, Reichard & Hamilton 1997, Kolar & Lodge 2001). Características invasoras comuns incluem rápido crescimento, rápida reprodução, elevada habilidade de dispersão, plasticidade fenotípica, tolerância a mudanças ambientais, associação com seres humanos e a capacidade de sobreviver a baixas densidades populacionais antes que se torne potencialmente invasora (Williams & Meffe 1998, Ewell et al 1999, Sakai et al 2001). Quanto ao ambiente, como os sistemas ecológicos são muito complexos, é extremamente difícil prever onde as espécies introduzidas serão bem sucedidas (Espínola & Júlio Jr 2007). Geralmente as principais características dos ambientes invadidos incluem: isolamento geográfico e histórico, baixa diversidade de espécies nativas, altos níveis de distúrbio por atividades antrópicas e ausência de inimigos co-adaptados, incluindo competidores, predadores, parasitas e doenças (Elton 1958, Blatz & Moyle 1993, Wolfe 2002, Bohn et al 2004).

Como conseqüências, após obter sucesso as espécies invasoras podem alterar o comportamento dos nativos em vários aspectos. Segundo Parker et al (1999), este impacto pode ser medido em cinco níveis - individual (incluindo taxas demográficas como mortalidade e crescimento); genético (introgressão, hibridização); populacional (abundância, crescimento populacional); de comunidade (riqueza de espécies,

diversidade) e ecossistema (disponibilidade de nutrientes, produtividade primária). Desta forma, as invasões causam vários transtornos, podendo ser ecológico, genético, ou ainda, econômico.

I.1 - Invasões de Peixes

A integridade dos ecossistemas aquáticos vem sendo desafiada mundialmente pelas espécies invasoras. Desta forma há uma necessidade crescente de compreender os processo de invasão e as diferenças ecológicas entre as espécies nativas e invasoras, e assim prever seus efeitos (Moyle & Light 1996, Alcaraz et al 2005). A fauna de água doce encontra-se confinada por barreiras geográficas, nos sistemas hidrográficos, e as alterações que ocorrem nas bacias e seus tributários por motivos naturais ou por ação antrópica influenciam todo o ecossistema, tornando peculiar a história natural das populações que as compõem (Kavalco 2003). Desta forma, os rios são considerados um dos ecossistemas mais intensamente degradados pelos humanos, principalmente pela intensa industrialização urbana (Oberdorff et al 2002) e tem sido o recipiente de muitas invasões, principalmente por espécies de peixes (Coop et al 2005, Garcia-Berthou et al 2005).

Um dos mais conhecidos casos sobre invasão e que trouxe conseqüências desastrosas para o ambiente invadido foi a da introdução da perca do Nilo no lago Vitória, um dos maiores lagos da África. Antes da invasão, o lago Vitória compreendia mais de 300 espécies que ocupavam os mais variados nichos (Witte et al 1992). No começo da década de 50, algumas espécies de peixes foram introduzidas

visando reverter o drástico declínio da população de peixes autóctones, em decorrência da sobrepesca. Em 1954, perca do Nilo também foi introduzida, mas somente muitos anos depois, na década de 80, foi observado um aumento explosivo deste predador (Goldschmidt et al 1993). Nesta década, o complexo ecossistema do Lago Vitória foi irreversivelmente destruído, com a extinção de centenas de espécies devido à predação pela perca do Nilo, além da super-exploração humana (Huges 1983, Barel et al 1985, Witte & Goudswaard 1985).

O Brasil destaca-se pela riqueza e diversidade de sua fauna de peixes, registrando mais de 2.500 espécies válidas pertencentes a famílias que ocorrem exclusivamente em ambientes de água doce (Buckup et al 2007). De maneira geral, pode-se afirmar que cada bacia fluvial brasileira possui sua própria fauna de peixes, com um número maior ou menor de formas semelhantes (Menezes 1970). Esta particularidade originou-se de uma série de fatores históricos, determinando quais espécies são aptas para colonizar e persistir em um determinado local.

As atividades antrópicas têm proporcionado vários caminhos pelos quais os peixes podem ultrapassar as barreiras naturais, incluindo a pesca, o escape de fazendas pesqueiras e a transferência de corpos d'água pela construção de barragens (Elvira & Almodóvar 2001, Rahel 2002). Uma das mais conhecidas quebras de barreiras foi à extinção das grandes cachoeiras de Sete Quedas (Guaíra, PR) após construção da barragem de Itaipu, em 1982. Esta construção uniu duas províncias ictiofaunísticas, as do alto e Baixo rio Paraná, e conseqüentemente, várias espécies de peixes do Baixo rio Paraná colonizaram com sucesso o novo habitat (Agostinho et al 1994). Entre estas espécies estão *Serrasalmus marginatus* (Agostinho et al 1994), um

citótipo de *Hoplias malabaricus* (Pazza & Julio Jr 2003) e *Gymnotus pantanal* (Margarido et al 2007).

Em alguns casos, a introdução de espécies invasoras pode alterar o ambiente de tal forma que espécies nativas tem seu número drasticamente reduzido (Agostinho et al 2002, Strecker 2006) No caso das espécies *S. marginatus* e *G. pantanal*, que invadiram a bacia do Alto rio Paraná através da construção de Itaipu, estas obtiveram tal sucesso que causaram uma redução nas espécies nativas, pois parecem ser mais agressivas (Agostinho & Julio Jr 2002, Margarido et al 2007). Outras vezes, as invasões podem até mesmo causar eventos de extinção (Barel 1985, Goldshmidt et al 1993). Entretanto, existem exemplos de invasores que se estabeleceram de tal forma que não provocaram a extinção de organismos nativos e parecem terem sido integrados a biota local (Moyle & Light 1996).

II - Conexões entre bacias hidrográficas

A região Neotropical exibe um padrão biogeográfico complexo, e várias hipóteses baseadas em diferentes processos tem sido propostas para explicar a origem da riqueza das espécies tropicais e o seu padrão de distribuição ao longo da América do Sul. Entre estas hipóteses, quatro delas predominaram na região: a hipótese palaeogeográfica, que consistiu na diferenciação alopátrica através de mudanças geológicas resultantes do soerguimento da cordilheira dos Andes durante o Terciário; a hipótese dos rios, que consistiu na fragmentação das biotas após o final do estabelecimento dos canais principais dos rios da América do Sul; a hipótese de “museu”, significando que espécies se originaram por diferenciação alopátrica resultante de incursões marinhas durante o Mioceno e finalmente, a hipótese de hidrogeologia, que resultou em especiação alopátrica pós dispersão resultante de múltiplos eventos de capturas de cabeceiras ou conexões temporais entre sistemas de drenagens (Hubert & Renno 2006).

Estudos referentes à biogeografia histórica de peixes da América do Sul tem sido cada vez mais freqüentes, revelando que existiram várias regiões de trocas de peixes entre distintas bacias hidrográficas, onde algumas delas ainda existem atualmente. Hubert & Renno (2006) investigaram o padrão biogeográfico de peixes

da ordem Characiformes na América do Sul, e segundo estes autores, foram identificadas pelo menos sete rotas de dispersão que conectaram distintas bacias, favorecendo a semelhança ictiofaunística atual entre estas. Uma das conexões mais conhecidas é do rio Casiquiare (Lovejoy & Araújo 2000, Sivasundar et al 2001, Turner et al 2004). O rio Casiquiare conectava e ainda conecta o alto rio Negro (Amazonas) ao alto rio Orinoco. Apesar desta conexão existir até o presente, para algumas espécies de peixes, este canal parece estar recentemente fechado para transferência (Lovejoy & Araújo 2000). Entretanto, uma região de conexão denominada savana inundada de Rupununi, que liga o rio Branco (Amazonas) e o rio Essequibo (Guiana) ainda atua como rota de dispersão.

Recentemente, são as ações antrópicas que tem causado a mistura de ictiofaunas entre bacias hidrográficas distintas. Dentre estas ações, com certeza a mais impactante é a construção de usinas hidrelétricas com a consequente quebra das barreiras naturais, como saltos e quedas. No Brasil, uma das mais bem investigadas quebra de barreiras foi à extinção dos Saltos de Sete Quedas (Guaíra, PR) pela construção da barragem de Itaipu em 1982, que levou a união das províncias ictiofaunísticas do alto e do baixo rio Paraná (Agostinho et al 1994). De acordo com Agostinho et al (1994), 17 espécies de peixes do baixo Rio Paraná colonizaram com sucesso o novo hábitat.

II.1 - Transposição do Rio Piumhi

A cabeceira do rio Piumhi está localizada na divisa entre municípios de Vargem Bonita e Piumhi, na região centro oeste do estado de Minas Gerais (Figura 1). Sua cabeceira é formada pela junção dos córregos Destêrro, Jorça e Confusão aproximadamente há 930 metros de altitude. Antes de 1963, o rio Pimhi era um tributário direto da bacia do rio Grande, que juntamente com o rio Paranaíba forma o rio Paraná, um dos importantes rios que banham a região Sul do Brasil, parte do Paraguai e norte da Argentina. As águas do rio Piumhi fluíam inicialmente na direção nordeste, em seguida para o Sudeste e finalmente para o Sul. Em parte de seu percurso atravessava uma região de planície alagada com mais de 38 Km de extensão, denominada antigamente como o Pantanal do rio Piumhi. À margem esquerda desse rio está localizada a cidade de Capitólio, onde as águas do Piumhi continuavam rumando ao Sul, por volta de 760m de altitude, onde se situava sua foz, na margem direita do rio Grande (Moreira-Filho & Backup 2005).

Segundo as folhas cartográficas de Vargem Bonita, Piumhi e Capitólio (escala 1.50.000), os principais afluentes do rio Piumhi, à margem direita, são córregos da Jorça, da Confusão e da Estiva, ribeirão dos Pavões, córregos dos Bois, da Onça, do Servo, Campão Grande, do Fumo, Mutuca, Penedo, ribeirão da Cachoeira e córregos Água Limpa, dos Soares e Araujo Quinze. Os afluentes da margem esquerda são córrego das Almas, ribeirão dos Almeidas, córrego Capão da Olaria, ribeirão das Minhocas e os córregos Pari Velho e Engenho da Serra Sete. Ressalta-se que até o início dos anos 60 os córregos Capão da Olaria, dos bois, da Onça, do Servo, Campão Grande, do Fumo e Mutuca não desaguavam diretamente nas margens do rio Piumhi, mas sim no grande pantanal por onde percorria o rio Piumhi. (www.transpiumhi.ufscar.br).

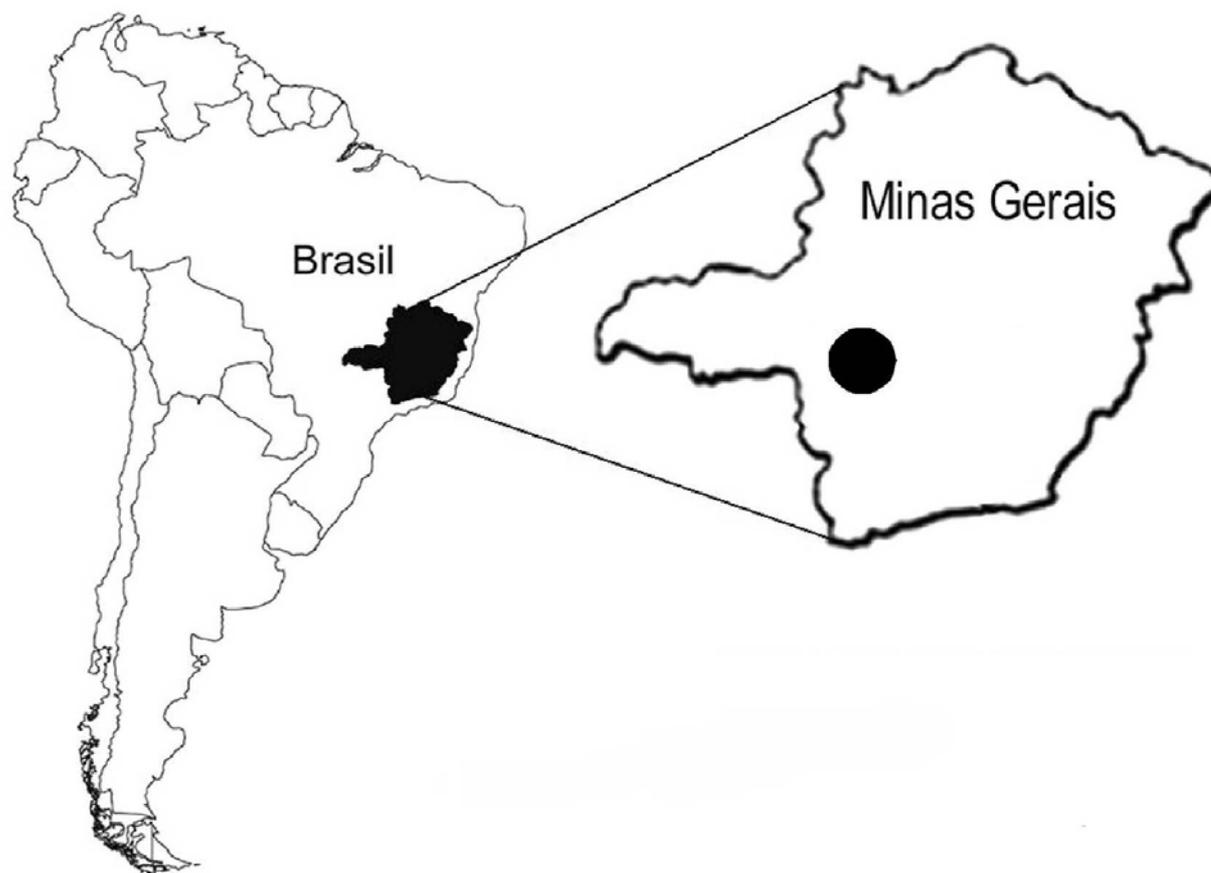


Fig. 1 - Mapa da América do Sul, destacando o estado de Minas Gerais. O círculo indica a localização de transposição do rio Piumhi.

II.1.1 - A transposição

Entre o final da década de 50 e início dos anos 60 estava sendo concluída a grande represa de Furnas, sobre o rio Grande, pertencente à bacia do Alto Paraná. A construção da barragem da usina resultou numa represa que alagou uma grande extensão de terra (Moreira-Filho 2006).

A hidrelétrica de Furnas está localizada perto dos municípios de São José da Barra, Passos e Capitólio, na região centro oeste de Minas Gerais. Quando as comportas da usina hidrelétrica fossem fechadas, o nível da água da represa seria de tal monta que alagaria a cidade de Capitólio, em Minas Gerais, e as águas da represa escoariam pela região do pântano do rio Piumhi, até atingir a bacia do rio São Francisco, conectando assim duas bacias hidrográficas: a do rio Paraná e a do rio São Francisco. Para solucionar parte desse problema e não alagar a cidade foi construído um dique (Figura 2) para conter as águas da represa de Furnas, nas imediações do município de Capitólio (Dique de Capitólio). Entretanto, esse dique também represou as águas do rio Piumhi, que naquela época era um dos afluentes da margem direita do rio Grande. Aproveitando a topografia da região do pantanal - por onde corria o leito do rio Piumhi, suas lagoas marginais e seus 22 afluentes - foi efetuado um sistema de drenagem, com a construção de aproximadamente 18 km de canais, alterando o curso do rio Piumhi (Figura 3), desviando as suas águas e as do pântano para o córrego Água Limpa, que deságua na margem esquerda do ribeirão Sujo, um dos afluentes da margem direita do rio São Francisco (Moreira-Filho 2006).

Para efetuar o desvio, foi necessário alterar o leito do córrego Água Limpa (afluente da margem esquerda do ribeirão Sujo), que foi totalmente dragado e alargado para receber todo o volume de águas vindas do rio Piumhi, de seus afluentes e da drenagem do pântano. O mesmo procedimento teve de ser feito em parte do leito do ribeirão Sujo. Na parte inferior da bacia do rio Piumhi, na região do dique formaram-se sucessões de grandes lagos interligados, cuja as águas também foram desviadas para um dos canais do rio Piumhi - canal de refluxo, que juntou-se

ao canal construído sobre o córrego de Água Limpa (Moreira-Filho & Buckup 2005, Moreria-Filho 2006).



Fig. 2 - Dique de Capitólio separando as águas do rio Grande (lado esquerdo) e as águas do rio Piunhi (lado direito).

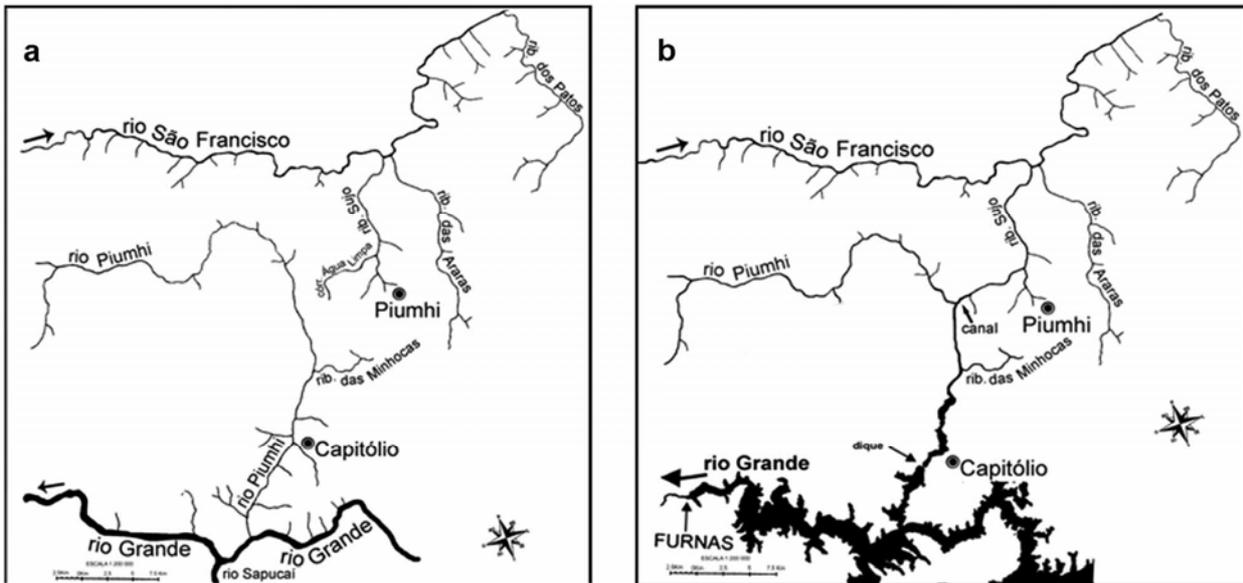


Fig. 3 - Hidrografia da região de transposição do rio Piumhi, mostrando em (a) antes de 1963 e (b) depois de 1963.

II.1.2 - Impactos causados pela transposição

O projeto da hidrelétrica de Furnas causou um grande impacto na configuração dos ambientes aquáticos. O segmento de água na parte inferior do rio Piumhi, próximo a cidade de Capitólio foi invertido. A porção sul do rio Piumhi, próximo à represa ficou estagnado em um grande lago, enquanto que a porção norte foi drenada por um canal artificial até o córrego de Água Limpa. O córrego de Água Limpa e parte do ribeirão Sujo foram dragados e o volume de água aumentou enormemente para a fluência do rio Piumhi. O impacto ambiental mais significativo foi a drenagem do grande pântano que originalmente estava associado ao rio Piumhi, que se tornou uma área de terra. As mudanças hidrológicas e a destruição da vegetação ciliar na drenagem do rio Piumhi resultaram em um aumento de sedimentos transportados para dentro do ribeirão Sujo, levando ao seu acúmulo em grandes bancos perto da boca do rio São Francisco (Moreira-Filho & Backup 2005).

Todas estas mudanças também tiveram, certamente, um impacto na biota aquática local, podendo ainda envolver uma alteração permanente da composição da biota ao longo do rio São Francisco. A importância do estudo da transposição do rio Piumhi para a biodiversidade torna-se evidente, considerando que é improvável que o ribeirão Sujo mantenha a soma de espécies que ocorrem tanto neste rio como as espécies presentes no rio Piumhi. Se as duas faunas, da bacia do rio Piumhi (original da bacia do rio Paraná) e do rio São Francisco forem forçadas à coexistência com esta conexão, é provável que algumas espécies pudessem ser conduzidas a uma redução drástica ou até mesmo à extinção, devido á prováveis competições e predações. Entretanto, é provável que espécies que obtenham sucesso e sobrevivam, se transformando em organismos invasores no novo sistema de drenagem (Moreira-Filho & Buckup 2005).

Portanto, inevitavelmente, a transposição de águas colocou em contato peixes de distintas bacias hidrográficas, que estavam separados há milhões de anos. Assim, toda a ictiofauna do rio Piumhi, que representava uma parcela da ictiofauna do sistema hídrico-alto Paraná, foi transferida para a bacia do rio São Francisco. Dentre todos os impactos ambientais ocasionados pela transposição do rio Piumhi para a bacia do rio São Francisco, a mistura das duas ictiofaunas, sem dúvida alguma, é o que mais chama a atenção dos ictiologistas. (www.transpiumhi.ufscar.br).

II.1.3 - O Pantanal do rio Piumhi

Antes da transposição do rio Piumhi existia um pantanal associado a esse rio com uma extensão aproximada de 20.000 há, denominado pantanal do Piumhi ou pantanal do Cururu (Figura 4). Alguns dos tributários do rio Piumhi, como os rio da Onça, Mutuca e do Cervo, não desaguavam diretamente no curso principal do rio Piumhi, mas fluíam dentro da grande área deste Pantanal (Moreira-Filho e Backup 2005).

Análises de antigas cartas cartográficas efetuadas da região, antes da transposição, demonstram que as nascentes de alguns tributários da margem esquerda do rio Piumhi e do antigo Pantanal apresentavam uma distancia de 400m a 1 km dos afluentes da margem direita do São Francisco, além de apresentarem altitudes similares, com cerca de 800 metros.

Deste modo, é perfeitamente plausível que, em épocas de cheias, tenham ocorrido conexões entre as bacias do alto Paraná e São Francisco através do Pantanal, pois estas duas bacias possuem um divisor de águas ténue e uma forma de relevo semelhante, possibilitando uma provável rota migratória para os peixes.

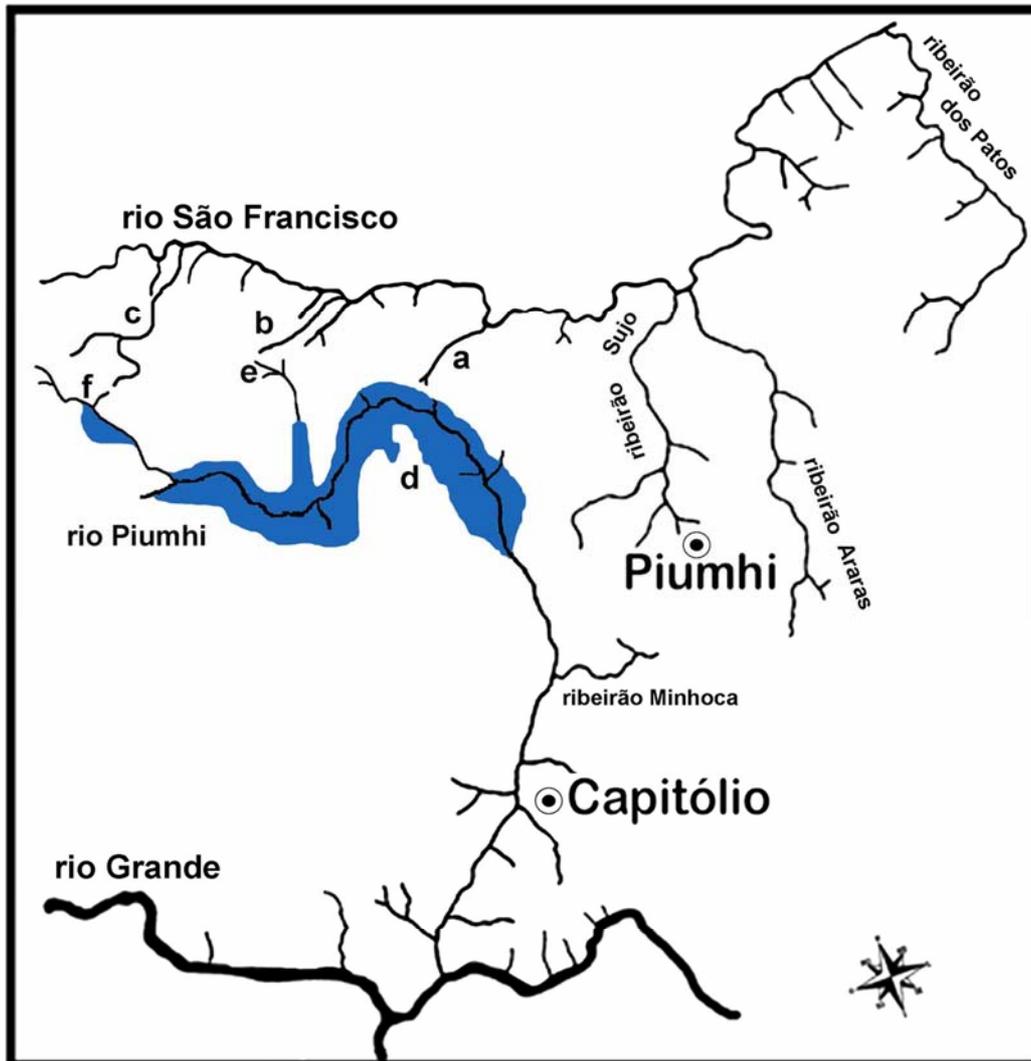


Fig. 4 – Hidrografia da região anterior à transposição do rio Piumhi, evidenciando o antigo Pantanal ali existente e alguns tributários dos rios São Francisco e Piumhi. (a) Córrego da Mamona; (b) Córrego do Bálamo; (c) Córrego do Varador; (d) Ribeirão dos Almeidas; (e) Córrego Capão da Olaria; (f) Pantanal do Cururu.

III - Os Characíformes

Os Characíformes são, sem dúvida, a ordem notavelmente mais numerosa e diversa entre os Ostariophysi. Apresentam uma grande variedade na forma do corpo, estrutura mandibular, dentição e anatomia interna. O comprimento máximo pode chegar a 1.4 metros, alcançado por *Hydrocynus goliath* do Congo, e o mínimo, aproximadamente 13 milímetros; alguns membros desta ordem são extremamente coloridos, apesar da maioria ser prateado; muitas espécies são pescadas para confeccionarem aquários (como os tetras) e, na América do Sul, espécies como *Brycon* são muito importantes na pesca alimentícia (Nelson 2006).

Dentre as características morfológicas marcantes dos Characíformes, os dentes costumam ser desenvolvidos (a maioria são carnívoros), o corpo geralmente é coberto por escamas (raramente ausentes em espécies sul-americanas), as nadadeiras pélvicas estão presentes (com 5-12 raios), a nadadeira anal varia de curta a moderadamente longa (com cerca de 45 raios), a linha lateral é geralmente oblíqua, os barbilhões são ausentes, e possuem cerca de 19 raios na nadadeira caudal (Nelson 1994).

Segundo Nelson (2006), a ordem Characiformes é composta por 1674 espécies de Characiformes, 270 gêneros e 18 famílias: Distichodontidae, Citharinidae, Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Lebiasinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae.

Quanto à ocorrência, apresenta-se como um grupo estritamente de água doce e tem sido foco de interesse para o desenvolvimento de hipóteses sobre a história biogeográfica de faunas de água doce. Uma vez que, em geral o modelo de tectonismo explica a evolução continental, o confinamento de muitos grupos de Characiformes na África e região Neotropical têm sido associados com o suposto isolamento da Gondwana e Eurásia, além do que a divergência dos Characiformes africanos e neotropicais têm sido associadas à abertura do Oceano Atlântico, que ocorreu entre 115-100 milhões de anos atrás (Buckup 1998).

III.1 - Família Parodontidae

A família Parodontidae Eigenmann, 1910, é considerada relativamente pequena quando comparada a outras famílias de Characiformes (Pavanelli 2003). Conhecidos popularmente como “canivetes” ou “charutos” no Brasil e como “virolitos” ou “rollizos” em outras localidades da América Latina onde são encontrados (Pavanelli 2003), estes peixes característicos de riachos montanhosos são tipicamente encontrados em altitudes que variam de 100 a 1000 metros e estão

distribuídos, segundo Roberts (1974), no leste do Panamá, nas costas pacíficas e caribenhas da Colômbia e costa pacífica do Equador, nas bacias do Orinoco e Amazonas, nas Guianas e ao sul incluindo a bacia do Prata. Em muitos rios formadores das bacias do Leste ainda não foi encontrado nenhum representante dessa família. As espécies de Parodontidae estão inseridas em três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Apareiodon* Eigenmann, 1916 e *Saccodon* Kner, 1964 (Roberts 1974; Pavanelli 2003).

De maneira geral, estas espécies são caracterizadas por serem robustas, com fortes nadadeiras peitorais, ventral e caudal, um corpo fusiforme, com o perfil dorsal mais arqueado do que o ventral. A cabeça possui harmonia com o corpo, o focinho é acarneirado e a boca localizada na porção inferior (Travassos 1957).

Os Parodontidae possuem uma mandíbula em forma de uma pá de bordo reto, sem dentes na borda anterior, e o pré-maxilar é bordeado por uma fileira de dentes delicados, cuspidados, com cúspides arredondadas (Britski 1972). A estrutura dentária nestes peixes é um dos importantes caracteres morfológicos que auxiliam na identificação dos três gêneros (Garavello 1977). O gênero *Parodon* apresenta pequenos dentes laterais na mandíbula, enquanto *Apareiodon* e *Saccodon* não possuem tais dentes. Enquanto o número de cúspides dos dentes pré-maxilares é um forte caráter para a diagnose das espécies dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, este caráter não pode ser considerado para as espécies que compõem o gênero *Saccodon*, o qual apresenta acentuado polimorfismo dentário (Garavello 1977).

Parodon foi o primeiro gênero a ser descrito por Valenciennes (1850) e *Saccodon* o segundo gênero, por Kner (1864). O gênero *Apareiodon* só foi descrito em 1916, por

Eigenmann que o diferenciou de *Parodon* pela ausência de dentes laterais (Pavanelli 1999).

Alguns trabalhos importantes sobre descrição morfológica e sobre comportamento foram realizados na presente família. Estudos realizados por Travassos (1952), em *Apareiodon mogiguaçuensis*, do rio Mogi-Guaçu, MG, demonstraram um perfil geral (dorsal e ventral) retilíneo, com escamas grandes e linha lateral nítida. A coloração de maneira geral é amarela e lateralmente possui manchas escuras formando faixas irregulares. Travassos (1957) também faz considerações sobre a espécie *Apareiodon machrisi* do rio Tocantins, em Goiás.

A descrição de uma nova espécie *Apareiodon vittatus* proveniente do rio Iguazu, PR, foi realizada por Garavello (1977), demonstrando uma grande relação com *A. piracicabae*, diferindo principalmente no número de faixas longitudinais sobre o tronco.

Caracteres merísticos e alguns dados biológicos foram descritos para *Apareiodon affinis* e *Parodon tortuosus*, ambos do rio Mogi-Guaçu, em Pirassununga, SP, por Nomura et al (1978) e Nomura (1979). Segundo estes autores, o canivete é iliófago e herbívoro, e dentro de cada classe de idade, os machos apresentam comprimento total menor que o das fêmeas, e estas se mostram mais pesadas do que os machos dentro de cada classe de comprimento.

Estudos etológicos realizados por Sazima (1980) nas espécies *A. piracicabae* e *A. ibitiensis* demonstraram que, além de possuírem nadadeiras peitorais e pélvicas bem desenvolvidas, são encontradas em águas correntes relativamente rasas, sobre substrato rochoso ou fundo pedregoso, apoiando-se em suas nadadeiras peitorais e pélvicas com a cabeça orientada contra a correnteza. Eles são nadadores ágeis, muito

rápidos e poderosos saltadores. Em águas muito rasas, eles se movem com a ajuda de suas nadadeiras. Neste trabalho, Sazima também descreve sobre a coloração que é variável para cada espécie, mas é basicamente composta por faixas, barras e manchas, resultando em efeito interativo com o ambiente, formado por rochas presentes nas corredeiras. O hábito alimentar é diurno e exames dos conteúdos intestinais de alguns exemplares revelam a presença de algas verdes e azuis, diatomáceas, pedaços de plantas vasculares, animais pequenos e partículas orgânicas. Estes alimentos são obtidos principalmente fixos a pedras ou no fundo, ou ainda fixos a plantas submersas (Sazima 1980).

Moreira-Filho (1983) realizou estudos integrando aspectos citogenéticos e ecológicos de quatro espécies de Parodontidae (*A. ibitiensis*, *A. affinis*, *A. piracicabae* e *P. tortuosus*) que se encontravam em simpatria e sintopia no rio Passa-Cinco, SP. Segundo este autor, há uma redução do potencial competitivo entre estas espécies que pode ser explicada pela ocorrência de uma variação sazonal quanto à sua abundância relativa; por possuírem épocas reprodutivas distintas; pela diferença quanto às distribuições espaciais em termos de abundância relativa, apesar da simpatria e sintopia; pela seletividade de alimentos, embora o hábito pareça ser o mesmo, e por uma maior exigência ou preferências seletivas em relação a determinados componentes abióticos (O_2 , por exemplo). Alguns destes fatores poderiam estar juntamente com as particularidades cariotípicas de cada uma destas quatro espécies (por exemplo, *A. affinis* possui um sistema de cromossomos sexuais múltiplos diferenciados), atuando no seu isolamento reprodutivo, possibilitando a convivência simpátrida e sintópica de forma aparentemente equilibrada.

O comportamento reprodutivo foi analisado por Barbieri et al (1983, 1985) para as espécies *A. affinis*, *A. ibitiensis* e *P. tortuosus* encontradas em sintopia no rio Passa-Cinco, SP, demonstrando que estas três espécies possuem períodos reprodutivos variáveis, sem sobreposição. Em *P. tortuosus*, a época de reprodução se estende por longos períodos com maior incidência de fêmeas maduras no bimestre de novembro/dezembro (Azevedo et al 1988).

Desde 1849, 34 espécies de Parodontidae foram descritas (13 *Apareiodon*, 18 *Parodon* e 3 *Saccodon*). Os estudiosos Carl Eigenmann e Henry Fowler descreveram o maior número de espécies de Parodontidae (Pavanelli 2003). Uma revisão realizada por Pavanelli (2003) reorganizou a família em 23 espécies válidas (10 *Apareiodon*, 10 *Parodon* e 3 *Saccodon*), além de outras 6 novas espécies de *Apareiodon* descritas por Pavanelli & Britski (2003), Pavanelli (2006) e Taphorn et al (2008) totalizando 15 espécies para o gênero *Apareiodon*. Recentemente Ingenito e Buckup (2005) descrevem mais uma espécie de *Parodon* (*P. morerai*) e atualmente são reconhecidas 11 espécies para este gênero. As espécies *Apareiodon vladii* e *Parodon moreirai* foram descritas graças a análises citogenéticas, cujos dados foram primordiais na diferenciação das demais espécies (Centofante et al 2002, Rosa et al 2006).

Com base nestes trabalhos, as espécies consideradas válidas são:

Gênero: *Apareiodon* Eigenmann, 1916

Espécies: *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879)

Apareiodon argenteus Pavanelli & Britski, 2003

Apareiodon cavalcante Pavanelli & Britski, 2003

Apareiodon davisi Fowler, 1941

Apareiodon gransabana Stanes & Schindler, 1993

Apareiodon hasemani Eigenmann, 1916

Apareiodon ibitiensis Campos, 1944

Apareiodon itapicuruensis Eigenmann & Henn, 1916
Apareiodon machrisi Travassos, 1957
Apareiodon orinocensis Bonilla, Machado-Alison, Silveira, Chernoff,
 Lopez & Lasso, 1999
Apareiodon piracicabae (Eigenmann, 1907)
Apareiodon tigrinus Pavanelli & Britski, 2003
Apareiodon vittatus Garavello, 1977
Apareiodon vladii Pavanelli 2006
Apareiodon agmatos Taphorn et al 2008

Parodon Valenciennes, in Curvier & Valenciennes, 1850

Parodon apolinari Myers, 1930
Parodon bifasciatus Eigenmann, 1912
Parodon buckleyi Boulenger, 1887
Parodon caliensis Boulenger, 1895
Parodon carrikeri Fowler, 1940
Parodon guyanensis Géry, 1959
Parodon hilarii Reinhardt, 1866
Parodon nasus Kner, 1859
Parodon pongoensis (Allen, 1942)
Parodon suborbitalis Valenciennes, 1850
Parodon moreirai Ingenito e Backup (2005)

Saccodon Kner, 1863

Saccodon dariensis (Meek & Hildebrand, 1913)
Saccodon terminalis (Eigenmann & Henn, 1914)
Saccodon wagneri Kner, 1863

No que diz respeito às relações de parentesco entre as espécies e gêneros de Parodontidae, pouco se conhece até o momento. Estas relações nunca foram

discutidas em conjunto, havendo apenas sugestões de possíveis relacionamentos entre algumas delas (Ingênito 2008).

Ingenito & Buckup (2005) analisando uma nova espécie de Parodontidae – *P. moreirai*, sugeriram que tanto os caracteres fornecidos por Starnes & Schindler (1993) quanto os caracteres tradicionais não são adequados para enquadrar sua nova espécie em nenhum destes dois gêneros, o que requereria a realização de estudos filogenéticos sobre a família Parodontidae. Ao descreverem essa espécie, indicaram que o padrão de coloração sugeriria uma relação mais próxima desta com as espécies de *Apareiodon*, embora caracteres osteológicos e dentários a posicionassem no gênero *Parodon*.

Moreira (2007) ao estudar as relações filogenéticas de Characiformes examinou três espécies de Parodontidae (*Apareiodon piracicabae*, *Parodon nasus* e *Saccodon wagneri*). Os resultados desse autor sugeriram que *Saccodon* é grupo irmão de *Parodon* e *Apareiodon*, sendo compatível a hipótese de Starnes & Schindler (1993). Entretanto, como Moreira (2007) examinou apenas três exemplares diafanizados, um de cada gênero, esses resultados podem ser subestimados (Ingênito 2008).

Ingênito (2008) realizou uma análise filogenética da família Parodontidae através do método cladístico de parcimônia, examinando caracteres osteológicos e de morfologia externa de todas as 28 espécies válidas de Parodontidae, além de uma espécie não descrita de *Parodon* e 17 espécies de Characiformes pertencentes ao grupo externo. Segundo este autor, *Saccodon* é realmente grupo irmão dos demais parodontidae, entretanto, as espécies tradicionalmente alocadas nos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* aparecem mescladas ao longo do cladograma, considerando então *Apareiodon* como sinônimo de *Parodon*, já que este foi descrito primeiramente. Ainda,

a ausência de dentes mandibulares, característica tradicionalmente utilizada para diagnosticar *Saccodon* e *Apareiodon* tem múltiplas origens, já que outras espécies de Parodontidae podem ou não apresentar dentes mandibulares (Ingênitto 2008).

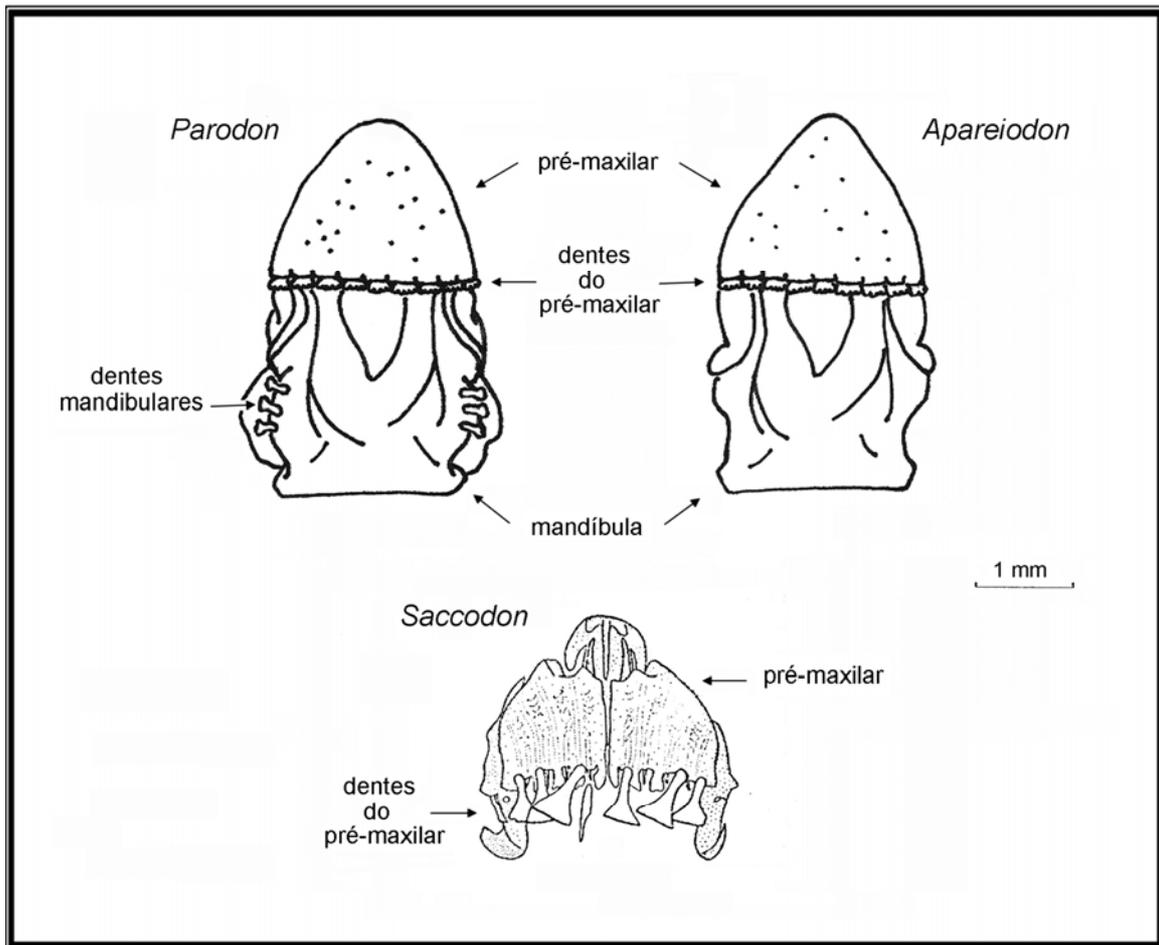


Fig. 5 - Diferenças na estrutura bucal em *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*.

IV- Os Gymnotiformes

Os “knifefishes” ou peixes elétricos Neotropicais (Gymnotiformes) representam um importante componente da ictiofauna noturna das águas continentais das Américas Central e Sul. São conhecidos popularmente como tuviras ou sarapós (Oyakawa et al 2006) e provavelmente o mais conhecido seja o poraquê (*Eletrophorus electricus*). Estão distribuídos desde os Pampas na Argentina até o Chiapas, no México (Albert & Miller 1995). No Brasil, a bacia Amazônica é a área com maior diversidade de Gymnotiformes (Albert & Campos-da-Paz 1998).

Dentro de seus limites, os Gymnotiformes habitam uma vasta ordem de ambientes aquáticos, incluindo canais de rios principais, pequenos riachos e lagoas, várzeas, igapós, florestas inundadas, rachaduras de substratos rochosos, águas caídas, bancos arenosos e barrentas piscinas formadas durante a estação seca e em estuários de alta condutibilidade. Algumas espécies, tais como *Eigenmannia virescens*, *Apteronotus albifrons* e *Gymnotus carapo* parecem ter uma distribuição geográfica muito ampla. Sem dúvida, outras são tão raras que a amostragem tem sido esporádica e a taxonomia pouco conhecida (Bullock et al 1979, Albert & Campos-da-Paz 1998, Albert et al 2005).

Os Gymnotiformes possuem hábitos noturnos e parecem ser carnívoros alimentando-se de insetos e crustáceos, embora as espécies maiores predem peixes (Bullock et al 1979, Albert & Campos-da-Paz 1998). A natação ocorre pela ondulação da nadadeira anal que se estende pela maioria da margem ventral do corpo (Albert 2001).

Morfológicamente, são totalmente diferentes dos demais peixes Neotropicais e são facilmente identificáveis. Seus representantes possuem um corpo alongado e comprimido lateralmente (*Gymnotus* e *Eletrophorus* são mais cilíndricos), escamas ciclóides, nadadeiras dorsal e caudal ausentes (nadadeira caudal é pequena em Apterotonidae), nadadeira anal muito longa com mais de 150 raios, olhos pequenos e geralmente recobertos por pele, órgão internos compactados na porção anterior do corpo e o ânus localizado na altura das nadadeiras peitorais (Alves-Gomes 1998). A porção caudal do corpo é alongada e a postura rígida em toda a porção pós-cranial do corpo é mantida por numerosos ossos intermusculares (Albert & Campos-da-Paz 1998, Oyakawa et al 2006).

Apesar de todas as características marcantes que singularizam esta ordem, provavelmente a especialização mais notável dos Gymnotiformes está na sua habilidade de gerar e detectar sinais elétricos no ambiente por meio de órgãos elétricos e diversos tipos de células especializadas, os eletroreceptores. Este sistema eletrogênico e eletrosensorial (SEE) é utilizado para orientação e comunicação simultaneamente, e desta forma, depende de um conjunto de operações sensoriais e motoras para a realização de suas atividades diárias. Os órgãos de descarga elétrica (ODEs) podem ser classificados como sendo do tipo “onda” ou “pulso”, dependendo da taxa de repetição (Alves-Gomes 1998). Devido as suas características incomuns,

mas relativamente simples, o SEE dos Gymnotiformes tem sido alvo de diversos estudos, principalmente sobre neurobiologia e ecologia (Heiligenberg 1990, Stopa & Hoshino 1999, Stoddard 2002).

A ordem Gymnotiformes é composta por 30 gêneros e aproximadamente 134 espécies (Albert & Crampton 2005), a maioria podendo ser encontrada no Brasil (Buckup et al 2007). Esse grupo de peixes vem sendo discutido com referência a propostas de classificação e suas relações de parentesco em geral desde Linnaeus até o presente. Segundo Nelson (2006), os Gymnotiformes são compostos por cinco famílias: Gymnotidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Sternopygidae e Aptereronotidae.

IV.1 - Família Gymnotidae

A família Gymnotidae, conhecida popularmente como naked-back knifefishes, é composta por dois gêneros: *Eletrophorus*, com uma única espécie - *Eletrophorus electricus*; e *Gymnotus*, com 32 espécies (Albert et al 2005, Oyakawa et al 2006). Estes dois gêneros caracterizam-se morfologicamente por possuírem um corpo mais cilíndrico e cabeça achatada. *Gymnotus* é o gênero de Gymnotiformes mais amplamente distribuído e é encontrado na sua maioria em águas continentais da América do Sul, principalmente na bacia amazônica, com 18 espécies (Albert et al 2005). Todas as espécies de *Gymnotus* possuem escamas ciclóides, boca grande e prognata e são fracamente elétricos, enquanto *Eletrophorus*, por outro lado, não possui escama, a boca é terminal e quando adultos são capazes de descargas elétricas

de até 600 volts. Os gymnotídeos são predadores noturnos agressivos e podem exibir um comportamento territorialista e de cuidado com os filhotes. Eles também podem respirar o ar atmosférico, onde *Gymnotus* são capazes de usar parte de seu sistema de bexiga-natatória em certas ocasiões, enquanto que *Eletrophorus* é considerado obrigatoriamente ar-atmosférico, tem um órgão respiratório oral vascularizado (Campos-da-Paz 2003).

O gênero *Gymnotus* possui ainda outra característica interessante: muitas de suas espécies podem ser encontradas em simpatria em diversas bacias hidrográficas. Além de algumas diferenças morfológicas, sua capacidade de detectar e gerar impulsos elétricos no ambiente aquático por meio de órgãos especializados permite que estes peixes se comuniquem, locomovam, alimentem-se e orientem-se, e por serem espécie-específicos, possam ainda reconhecer seus parceiros para o acasalamento. Todos estes fatores possibilitam a coexistência local, podendo ser encontradas até oito espécies em simpatria e sintopia no rio Tefé, na bacia Amazônica (Crampton e Albert 2005, Albert et al 2005).

IV.2 - Família Sternopygidae

A família Sternopygidae, composta por seis gêneros e trinta espécies válidas, são conhecidas como “glass knifefishes” ou “rattail knifefish” e possuem uma combinação única de características entre os Gymnotiformes: dentes viliformes em ambas maxilas, olhos grandes, nadadeira anal originada no istmo, sem papila urogenital, nadadeira caudal ou órgão dorsal. Os sternopygídeos possuem um órgão

de descarga do tipo tom, caracterizado por uma hiperpolarização monofásica negativa. Muitas espécies são altamente comprimidas lateralmente e translúcidas em vida (por exemplo *Eigenmannia*, *Rhabdolichops*) (Albert 2003).

Os Sternopygidae estão confinados à região Neotropical úmida, estendendo-se desde o rio do Prata (Argentina) até o rio Tuirá (Panamá). No Brasil, estão amplamente distribuídos na bacia Amazônica (Albert 2001). O gênero *Eigenmannia* é composto por oito espécies válidas e são consideradas ecologicamente importantes em vários sistemas ribeirinhos, constituindo grande proporção da biomassa e formando a base alimentar nos rios amazônicos (Lundberg et al 1987).

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Britski (1988) descreveu duas espécies de *Apareiodon* para a bacia do rio São Francisco, na região de Três Marias - *Apareiodon* sp. A e *Apareiodon* sp. B, muito semelhantes à *Apareiodon ibitiensis* e *Apareiodon piracicabae*, respectivamente, descritas para a bacia do alto rio Paraná. Entretanto, Pavanelli (2003, 2007) cita que *A. ibitiensis* e *A. piracicabae* já existem na bacia do rio São Francisco. Através do conhecimento sobre a história da transposição do rio Piumhi, o presente estudo tem como objetivo geral verificar, através de ferramentas citogenéticas, se houve a transferência de espécies de Parodontidae da bacia do alto rio Paraná para a bacia do rio São Francisco.

Os dados obtidos neste trabalho, juntamente com os dados citogenéticos disponíveis na literatura para outras espécies de Parodontidae poderão responder várias questões, como (1) a de possíveis hibridações pela mistura das ictiofaunas, (2) conseqüências da coexistência em simpatria de espécies próximas que durante muito tempo ocorriam em alopatria, (3) a possível existência de espécies “invasoras” transpostas do sistema do alto Paraná com espécies altamente endêmicas do São Francisco, e (4) a comprovação se as espécies tidas como novas na bacia do São

Francisco são realmente distintas ou seriam espécies transpostas do rio Grande (Alto Paraná).

Além de verificar a transferência de espécies de Parodontidae, o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Esclarecer através de técnicas citogenéticas as reais identidades de *Apareiodon* sp. A e *Apareiodon* sp. B presentes na bacia do rio São Francisco, região de Três Marias;

- Confirmar a suspeita da presença de um sistema de cromossomos sexuais em *A. ibitiensis*;

- Aplicar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando as sondas de DNA ribossômico 5S e 18S, buscando identificar a localização e número destes sítios dentro do complemento cromossômico em espécies ainda não submetidas a tais técnicas

- Aplicar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando a sonda de DNA satélite pPh2004 de *P. hilarii* (Parodontidae) nas demais espécies de Parodontidae a fim de realizar comparações quanto à distribuição deste DNA repetitivo.

- Analisar através de técnicas citogenéticas espécies da família Gymnotidae e Sternopigydae (Gymnotiformes) presentes em uma região de transposição de rios.

MATERIAL

I - Espécies analisadas e locais de coleta

As espécies coletadas foram:

Ordem Characiformes: Família Parodontidae

Bacia do rio São Francisco - Estados de Minas Gerais, Brasil (Figura 6)

Apareiodon piracicabae (Figura 7a): foram analisados 10 exemplares (5 machos e 5 fêmeas) coletados no rio Piumhi, município de Piumhi e 10 machos e 8 fêmeas coletados no riacho Barreiro Grande, município de Três Marias.

Apareiodon ibitiensis (Figura 7b): analisaram-se 16 exemplares (11 machos e 5 fêmeas) coletados no Ribeirão das Araras (Figura 9), no município de Piumhi e 6 fêmeas e 4 machos foram analisados, coletados no riacho Frio, município de Três Marias.

Parodon nasus (Figura 7c): foram analisadas 4 fêmeas coletadas na calha principal do rio Piumhi, próximo a sua nascente (Figura 10) e 2 machos coletados no Ribeirão Araras, município de Piumhi.

Parodon hilarii (Figura 7d): analisaram-se 12 exemplares de *P. hilarii* (5 machos e 7 fêmeas) coletados no Ribeirão das Araras, afluente da margem direita do rio Piumhi, no município de Piumhi.

Bacia do alto rio Paraná - Estado de São Paulo, Brasil (Figura 6)

Apareiodon affinis (Figura 7e): foram analisadas 15 exemplares (5 fêmeas e 10 machos) coletados no rio Passa-Cinco (afluente do rio Piracicaba), no município de Ipeúna (Figura 11).

Apareiodon piracicabae: 12 machos e 6 fêmeas foram analisados, coletados no rio Mogi Guaçu, município de Pirassununga (Figura 12).

Apareiodon ibitiensis: analisaram-se 12 exemplares (7 fêmeas e 5 machos) coletados no rio Passa-Cinco (afluente do rio Piracicaba), no município de Ipeúna.

Parodon nasus: foram analisadas 20 exemplares (8 fêmeas e 12 machos) coletados no rio Passa-Cinco (afluente do rio Piracicaba), no município de Ipeúna.

Ordem Gymnotiformes: Família Gymnotidae**Bacia do rio São Francisco - Minas Gerais, Brasil (Figura 6)**

Gymnotus sylvius (Figura 8a): foram analisados 16 exemplares (13 machos e 3 fêmeas) coletados no Ribeirão Minhoca (Figura 13), confluência com o calha principal do rio Piumhi, no município de Capitólio; 10 exemplares (6 machos e 4 fêmeas) do Ribeirão dos Patos, afluente da margem direita do rio São Francisco e 2 exemplares (1 macho e 1 fêmea) no antigo Pantanal.

Ordem Gymnotiformes: Família Sternopygidae**Bacia do rio São Francisco - Minas Gerais, Brasil (Figura 6)**

Eigenmannia virescens (Figuras 8b e 8c): analisaram-se 7 exemplares (4 machos e 3 fêmeas) coletados no Ribeirão Minhoca, município de Capitólio e 19 exemplares (4 machos e 15 fêmeas) no Ribeirão dos Patos, afluente da margem direita do rio São Francisco.

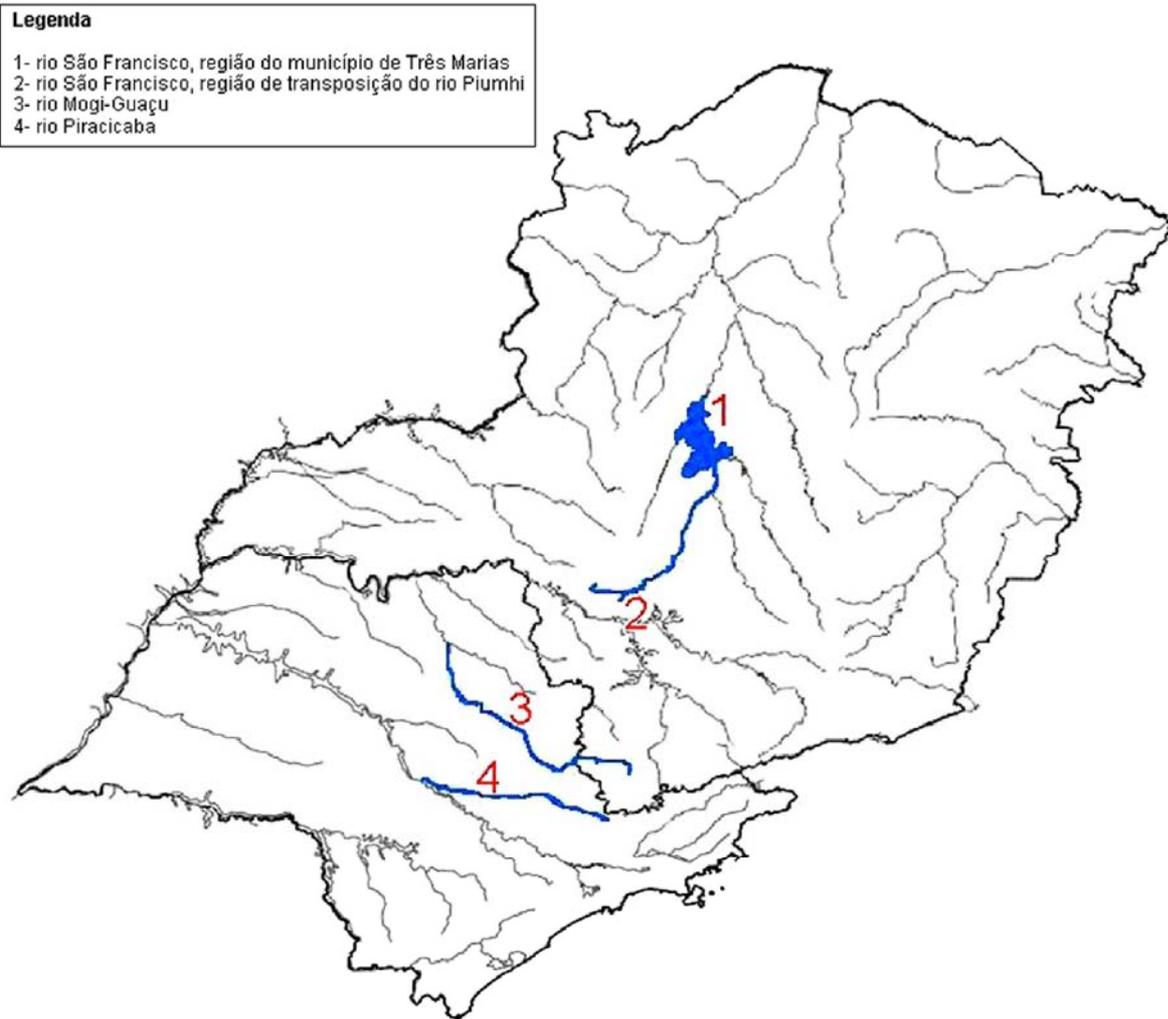


Fig. 6 - Mapa indicando as regiões de coletas nas bacias do alto rio Paraná e rio São Francisco.

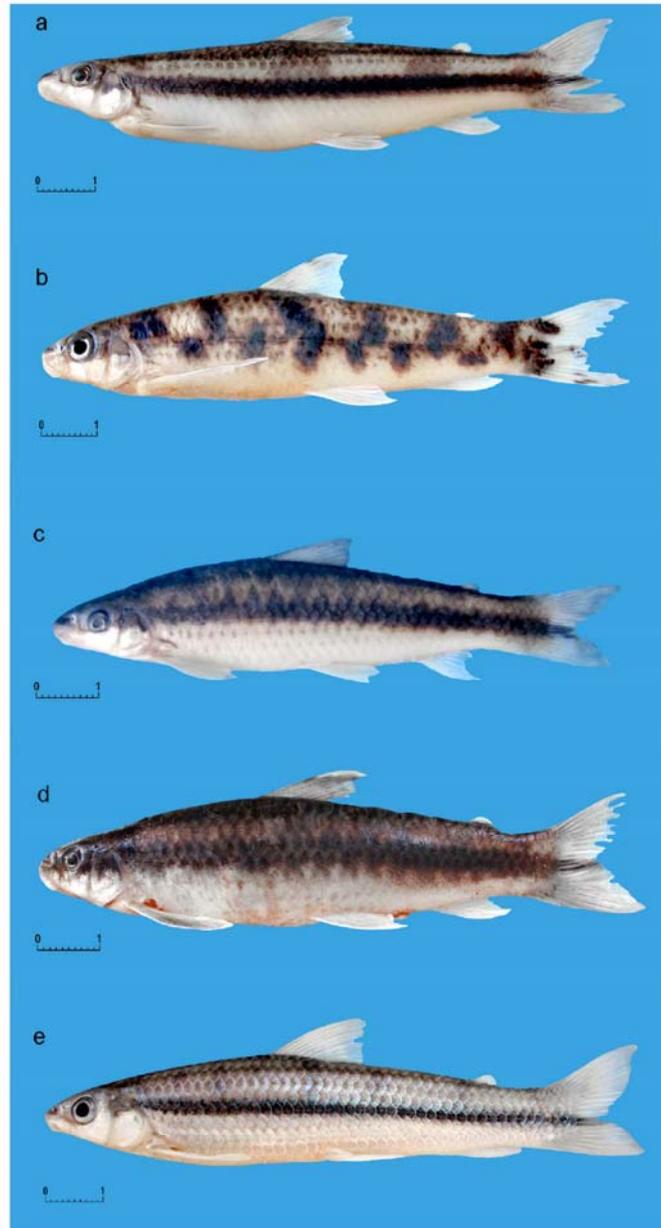


Fig. 7 - Espécies coletadas de Parodontidae: (a) *Apareiodon piracicabae*, (b) *Apareiodon ibitiensis*, (c) *Parodon nasus*, (d) *Parodon hilarii*, (e) *Apareiodon affinis*. A barra significa 1 cm.

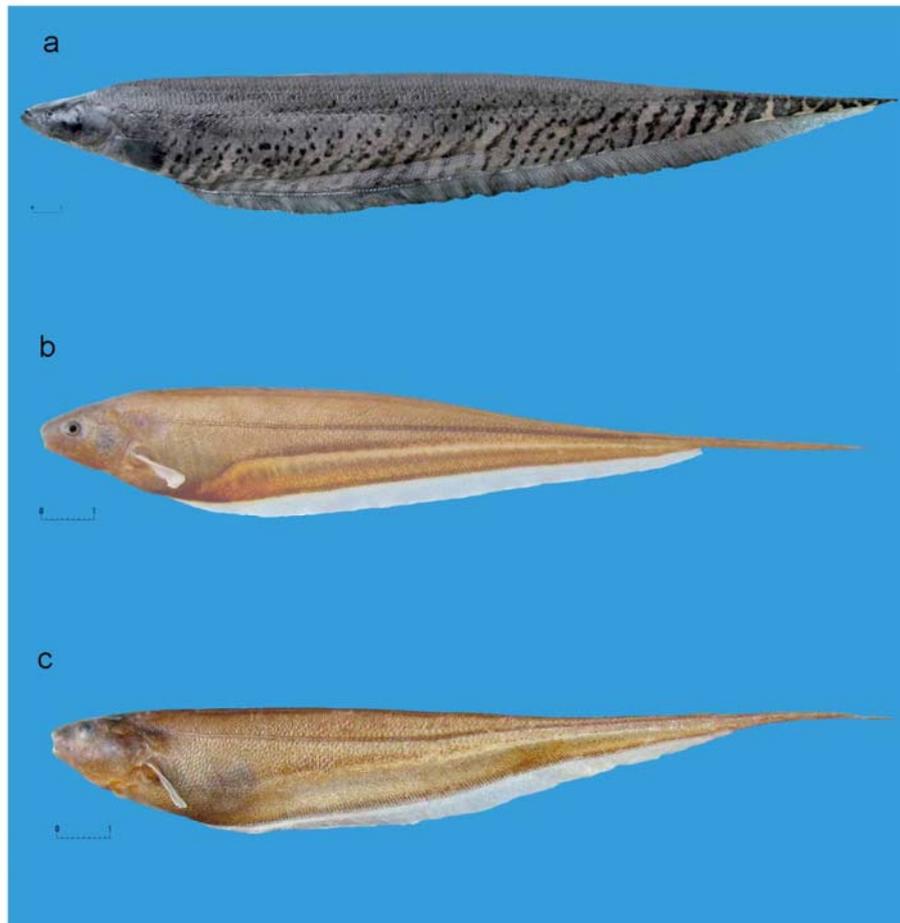


Fig. 8 - Espécies de Gymnotiformes coletados: (a) *Gymnotus sylvius* e *Eigenmannia virescens* (b) citótipo A e (c) citótipo B. A barra significa 1 cm.



Fig. 9 - Ribeirão Araras, MG.



Fig. 10 - Cachoeira do rio Piumhi. A nascente do rio Piumhi se localiza acima da cachoeira.



Fig. 11 - Rio Passa-Cinco, SP.



Fig. 12 - Rio Mogi-Guaçu, SP.



Fig. 13 - Ribeirão Minhoca, MG.

METODOLOGIA

I - Preparação de cromossomos mitóticos

O órgão utilizado para a obtenção de metáfases mitóticas foi a porção anterior do rim, uma vez que esta possui função hematopoiética. Para a preparação e obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica adaptada por Bertollo et al (1978), que consiste na extração, homogeneização e hipotonização do rim, seguido de sucessivas centrifugações e lavagens com fixador (metanol/ácido acético, 3:1), descartando-se o sobrenadante. O material fixado foi acondicionado em tubos de “Eppendorf” e armazenado em freezer, para posterior análise. Alternativamente, também foram utilizadas técnicas de preparação *in vitro* (Moreira-Filho & Bertollo 1990 e Gold et al 1990).

Para uma boa análise cromossômica, é necessária a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Para isto, foi utilizada a indução do aumento na frequência mitótica nas células de defesa através da injeção de uma suspensão de levedura, segundo Lee & Elder (1980).

Para se determinar o número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa e análise em microscópio óptico.

I.1 - Técnica de suspensão celular - preparação direta *in vivo* (Bertollo et al 1978)

- 1- Injetar intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção 1 mL/100 g de peso animal durante 30-40 minutos após o qual sacrifica-se o animal e retira-se o rim anterior.
- 2- Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em uma cuba de vidro contendo 7-10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.
- 3- Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.
- 4- Incubar o material em estufa a 37°C durante 25-30 minutos.
- 5- Pingar 5-10 gotas de fixador METANOL-ÁCIDO ACÉTICO (3:1), ressuspender o material, e centrifugá-lo durante 10 minutos a 900 rpm.
- 6- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirar o sobrenadante e acrescentar 7-10 mL de fixador. Ressuspender o material e centrifugá-lo durante 10 minutos.
- 7- Repetir o passo número 6 mais duas vezes.
- 8- Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1-2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material, e ressuspender o material.
- 9- Acondicionar o material em tubos de plásticos do tipo Eppendorf e guardá-lo no refrigerador.

I.2 - Técnica alternativa - preparação *in vitro* (Moreira-Filho & Bertollo 1990)

- 1- Sacrificar o animal e retirar o rim anterior.
- 2- Colocar o material, previamente lavado em solução hipotônica, em uma cuba

de vidro contendo 7-10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M.

3- Dissociar o material com pinças de dissecação para separar as células, completando o processo com o auxílio de uma seringa hipodérmica.

4- Incubar o material em estufa a 37°C. Após passar 10 minutos, pingar 1-2 gotas de solução aquosa de colchicina 0,0125%. Deixar na estufa por mais 15-20 minutos, após o qual pinga-se 5-10 gotas de fixador, ressuspendendo o material.

5- Centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm.

6- Retirar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta Pasteur e proceder à fixação segundo a técnica de suspensão celular.

I.3 - Técnica alternativa - preparação *in vitro* (Gold et al 1990)

Alternativamente ainda, frações do rim anterior são colocadas em solução de Hanks, dissociadas e incubadas por 20-40 minutos à 37°C, com 1-2 gotas de solução de colchicina 0,0125%. Após esse procedimento, o material é hipotonizado e fixado segundo a técnica de suspensão celular.

II- Indução de aumento do número de mitoses

Faz-se necessário à obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Uma vez que o órgão utilizado, o rim anterior,

possui função hematopoiética, ou seja, produzir células sangüíneas, tanto as de defesa como as de transporte de O_2/CO_2 , foi utilizado a indução de aumento na freqüência de mitoses nas células de defesa (suspensão de levedura).

II.1 - Suspensão de levedura (Lee & Elder 1980)

Injetar intraperitonealmente suspensão de levedura (0,5 g de fermento de padaria + 1,5 g de dextrose + 6 mL de H_2O) na proporção de 1 mL/ 100 g de peso animal durante 24 horas, após o qual processa-se o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

III - Preparo de lâminas

- 1- Pingar 1-3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, levemente aquecida, deixando-a secar ao ar.
- 2- Corar a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($Na_2HPO_4 \times 12 H_2O + Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), pH=6,8 , por 7 minutos, ou tratar a lâmina segundo as técnicas de bandas-C, impregnação por prata, fluorocromos ou hibridização *in situ*.

IV - Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (Howell & Black 1980)

- 1- Colocar sobre uma lâmina previamente preparada 2-3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina incolor + 50 mL de H₂O + 0,5 mL de ácido fórmico).
- 2- Adicionar sobre cada gota de gelatina 1 gota de água destilada e 2 gotas de AgNO₃ 50%.
- 3- Cobrir com lamínula e colocar em estufa a 60°C durante 3-6 minutos.
- 4- Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente.
- 5- Secar a lâmina e observar ao microscópio.

V - Detecção da distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972)

Para a detecção de heterocromatina constitutiva (bandas-C), foi utilizada técnica convencional de Sumner (1972), com algumas adaptações.

- 1- Tratar a lâmina com HCl 0,2N por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2- Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.
- 3- Colocar a lâmina em solução aquosa de Ba(OH)₂ 5% a 42°C durante 1 minuto e meio.
- 4- Mergulhar a lâmina três vezes em HCl 0,2N, lavar em água corrente e deixar

secar.

5- Colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos.

6- Lavar a lâmina em água corrente, deixar secar e corar com Giemsa 6% durante 5 minutos.

Observação: Em alguns casos, as metáfases foram coradas com Iodeto de Propídeo, misturando por lâmina 25µl de antifading e 1µl de Iodeto de Propídeo (50 µg/ ml).

VI- Coloração cromossômica com fluorocromo Cromomicina A₃ + Distamicina A (Schmid 1980)

A coloração com Cromomicina A₃, fluorocromo GC-específico, utilizando como contracorante a Distamicina A, foi realizada conforme o método de Schmid (1980):

- 1- Colocar 150 µL da solução de Distamicina A (0,3mg/mL sobre a lâmina), cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos; escorrer a lamínula e lavar em tampão McIlvaine; deixar secar por alguns minutos;
- 2- Acrescentar 150 µL da solução de Cromomicina A₃, sobre a lâmina, cobrir novamente com lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro;
- 3- Escorrer a lamínula e lavar o material em três banhos sucessivos no tampão McIlvaine, por aproximadamente 1 minuto cada;
- 4- Deixar secar ao ar e montar com lamínula utilizando como meio uma solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso;

5- Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias;

6- Analisar em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

VII - Técnica de localização cromossômica de genes ribossômicos 18S, 5S e DNA satélite Pph2004 por hibridização in situ com sondas fluorescentes (FISH) (Pinkel et al 1986) com algumas modificações

VII.1 - Sondas

Para as análises de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foram utilizados sondas de DNAr 18S, 5S e de DNA satélite pPhi2004. Estas sondas já se encontram disponíveis no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos, que foram obtidas a partir das espécies *Leporinus elongatus* - Pisces Anostomidae - para DNAr 5S (Martins & Galetti 1999); *Prochilodus argenteus*- Pisces, Prochilodontidae - para DNAr 18S (Hatanaka & Galetti 2004) e *Parodon hilarii* - Pisces, Parodontidae - para DNA satélite pPh2004 (Vicente et al 2004).

VII.2 - A técnica

Primeiro dia:

Preparação da sonda:

a- _____ μ l de H₂O *mili-Q* autoclavada

5 μ l de dNTP Mix

_____ μ l de sonda (a quantidade necessária p/ 1,0 μ g de DNA sonda)

5 μ l de enzima

50 μ l (Volume final de solução)

b- homogeneizar com uma micropipeta, levar ao banho-maria (isopor) por 1 hora e 45 minutos a 15-16°C.

c- Adicionar 2,5 μ l de stop buffer (do kit) para finalizar a reação.

d- Precipitar o DNA com acetato de sódio 3M (1/10 do volume total) mais etanol 100% gelado (2x o volume), de preferência *overnight*.

Segundo dia:

Sonda

1- Centrifugar em velocidade máxima por 15 minutos; descartar o sobrenadante vertendo o tubo p/ baixo;

2- Lavar o material com 50 μ l de etanol 70% gelado;

3- Centrifugar em velocidade máxima por 15 minutos; descartar o sobrenadante vertendo o tubo p/ baixo; secar em estufa a 37°C até o começo da tarde.

4- Pingar as lâminas.

Preparação das Lâminas (tarde):

Tratamento com RNase

1- Incubar as lâminas em 90 μ l de RNase (0,4% RNase/2xSSC) sob lamínula, a 37°C por uma hora em câmara úmida com água e 2xSSC

- 2- Lavar 2x por 5 min em 2xSSC com agitação.
- 3- Incubar as lâminas em 2xSSC a 72,5°C por 45 minutos.
- 4- Desidratar as lâminas em série de 70% etanol e 100% por 5 minutos cada a temperatura ambiente.
- 5- Secar ao ar.
- 6- Denaturar as lâminas em 0,05N NaOH/2xSSC por 3 minutos exatos.
- 7- Desidratar as lâminas em série de etanol 70% e 100% por 5 minutos cada a temperatura ambiente.
- 8- Secar ao ar.

Hibridação

Adicionar ao tubo com a sonda:

12µl de H₂O mili-Q

6µl de 20xSSC

30µl de formamida

12µl de sulfato dextrano 50%

60µl (Volume final de solução/lâmina)

- 1- A solução de hibridação deve ser colocada no banho-maria a 100°C por 10 minutos para desnaturar a sonda;
- 2- Retirar do banho-maria e colocar imediatamente no gelo;
- 3- Colocar 58µl de solução de hibridação em lamínula para cada lâmina. Arrumar as lâminas em câmara úmida e incubá-las a 37°C por 12 horas (*overnight*). A câmara úmida deve ser preparada com 2xSSC e H₂O.

Terceiro dia

- 1- Lavar as lâminas em 1xSSC por 5 minutos a 37°C com agitação.
- 2- Lavar as lâminas em 1xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação.
- 3- Lavar as lâminas em 0,05%/4xSSC 2x por 5 minutos cada com agitação.
- 4- Incubar as lâminas em tampão 5% *NFDM*/4xSSC por 15 minutos
- 5- Lavar 2x 5min com *Tween* 0,05%/4xSSC, ambiente (sob agitação).
- 6- Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1µl de FITC + 90µl 5% *NFDM*/4xSSC por lâmina) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- 7- Lavar 3x 5min com *Tween* 0,05%/4xSSC, ambiente (sob agitação);
- 8- Incubar com 90 µl de anti-avidina-biotina conjugada (1,0µl anti-avidina +89µl 5% *NFDM*/4xSSC por lâmina durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- 9- Lavar 3x 5min com *Tween* 0,05%/4xSSC, ambiente (sob agitação).
- 10- Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1µl de FITC + 90µl 5% *NFDM*/4xSSC por lâmina) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente

Montagem da Lâmina

As lâminas foram montadas com dois fluorocromos distintos:

a- Iodeto de Propídio - Misturar, por lâmina, 25µl de antifading e 1µl de Iodeto de Propídio (50 µg/ ml).

b- DAPI - Misturar, por lâmina, 25µl de antifading e 0,025µl de DAPI (0,2mg/ml)

Cobrir com lamínula e guardar no escuro.

VIII - Estudos cariotípicos

As preparações (Giemsa convencional, banda-C e AgRONS) foram analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram fotografadas em filme Kodak Imagelink (ou similar), preto e branco, ASA 25. As lâminas de FISH foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro apropriado (450-490nm de comprimento de onda).

As fotografias dos cromossomos foram recortadas e, em seguida, os homólogos pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico). A classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan et al (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB):

RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos

metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados com 2 braços cromossômicos.

As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro e os cromossomos dispostos em pranchas, separados de acordo com a sua morfologia e tamanhos.

Resultados

Capítulo 1 - Cromossomos sexuais ZZ/ZW diferenciados em *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): Citotaxonomia e biogeografia.

Resumo

Análises cromossômicas convencionais e moleculares foram realizadas em três populações de *Apareiodon ibitiensis* amostradas nas bacias hidrográficas do rio São Francisco e do alto rio Paraná. Os resultados obtidos para as três populações mostraram um número diplóide ($2n=54$ cromossomos) conservado, fórmula cariotípica composta por (50m-sm+4st) e um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW antes não identificado para a espécie. A análise do bandamento-C submetido à coloração com iodeto de propídio evidenciou bandas centroméricas e terminais localizadas nos cromossomos dos exemplares das três populações, além de permitir a identificação do heteromorfismo de regiões heterocromáticas nos cromossomos Z e W. O número de sítios de rDNA 18S localizados pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi variável entre as populações da bacia do rio São Francisco e alto rio Paraná. A localização dos sítios de rDNA 5S se mostraram comparáveis em

um par de cromossomos metacêntrico. Assim, neste trabalho é proposta a presença de um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW também para a espécie *A. ibitiensis* entre os Parodontidae, bem como, apresentada uma hipótese a cerca dos possíveis estágios de diferenciação do cromossomo W nesta espécie por acúmulo de DNA, evidenciando variações geográficas para este caráter possivelmente como consequência do isolamento geográfico reprodutivo entre elas.

Palavras-Chave: citogenética de peixes; evolução genômica, heterocromatinização; diversificação cariotípica.

Introdução

Uma extraordinária diversidade de mecanismos de determinação sexual tem sido estudada nas últimas décadas, onde as espécies podem responder tanto a fatores ambientais quanto a mecanismos genéticos. Os répteis, por exemplo, possuem determinação do sexo dependente da temperatura, contudo, outros grupos apresentam mecanismos genéticos, isto é, cromossomos sexuais que incluem os sistemas XX/XY em mamíferos e ZZ/ZW em pássaros (Vallender & Lahn 2006). Já a determinação do sexo em peixes apresenta uma ampla diversidade de sistemas e mecanismos, sujeito a eventos ambientais, genéticos, fatores comportamentais e fisiológicos (Devlin & Nagahama 2002).

Considerando os estudos sobre cromossomos sexuais, os peixes são caracterizados por uma notável variabilidade de sistemas, envolvendo cromossomos homólogos diferenciados e indiferenciados, sistemas simples ou múltiplos, com ocorrência de heterogametia masculina ou feminina (Almeida-Toledo & Foresti 2001). Apesar da maioria das espécies de peixes não apresentar cromossomos sexuais distintos, nove sistemas envolvendo heterogametia masculina (XY, X0, X₁X₂Y e

XY₁Y₂), heterogametia feminina (ZW, Z0 e ZW₁W₂, Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) e um sistema não usual WXZ já foram descritos (Moreira-Filho et al 1993; Devlin & Nagahama 2002; Oliveira et al 2008).

A família Parodontidae é composta por três gêneros: *Apareiodon* Eigenmann, *Parodon* Valenciennes e *Saccodon* Kner, os quais são diferenciados por poucos e frágeis caracteres morfológicos (Pavanelli & Britski 2003). Possuem uma ampla distribuição geográfica pela América do Sul e parte do Panamá, exceto em algumas bacias litorâneas e Patagônia. Análises citogenéticas em Parodontidae tem indicado um número diplóide conservado de 54 cromossomos. Entretanto, uma grande diversidade tem sido observada entre os marcadores cromossômicos de fórmula cariotípica, heterocromatina e localização do DNA satélite pPh2004, atividade das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), número e localização de sítios de rDNA 18S e 5S, cromossomos supranumerários e presença ou ausência de cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados (Moreira-Filho et al 1993; Jesus & Moreira-Filho 2000; Centofante et al 2002; Vicente et al 2003; Bellafronte et al 2005; Rosa et al 2006; Vicari et al 2006). Até o presente momento, dois sistemas distintos de cromossomos sexuais heteromórficos foram descritos na família Parodontidae: um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ em *Apareiodon affinis* (Moreira-Filho et al 1980) e um sistema simples do tipo ZZ/ZW para *Parodon hilarii* (Moreira-Filho et al 1993), *P. moreirai* (citado como *Parodon* sp. por Centofante et al 2002), *Apareiodon vladii* (citado como *Apareiodon* sp. por Rosa et al 2006) e *Apareiodon* sp. (Vicari et al 2006). Jesus & Moreira-Filho (2000) estudaram diferentes espécies do gênero *Apareiodon* onde não relataram a ocorrência de cromossomos sexuais em *Apareiodon ibitiensis*. Posteriormente, Vicari et al (2006)

analisaram uma população de Parodontidae semelhante a *A. ibitiensis*, identificada até o momento como uma espécie ainda não descrita (*Apareiodon* sp.), o que foi reforçado pela verificação da existência de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW.

Em algumas espécies de Parodontidae, caracteres morfológicos são pouco consistentes para a identificação taxonômica. Nestes casos a citogenética tem sido uma importante ferramenta na diferenciação das populações e espécies. A espécie *A. ibitiensis* foi primeiramente descrita apenas para a bacia do alto rio Paraná. Entretanto, Pavanelli (2003, 2007) considera *A. ibitiensis* também para a bacia do rio São Francisco. Com base neste cenário, o presente trabalho apresenta novas caracterizações cariotípicas para diferentes populações de *Apareiodon ibitiensis* e discute o estado de diferenciação de cromossomos sexuais nesta espécie.

Material e Métodos

Estudos cromossômicos foram realizados em populações de *A. ibitiensis* de três localidades, pertencentes a duas bacias hidrográficas distintas: (1) Bacia do alto rio Paraná - 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) coletados no rio Passa-Cinco (município de Ipeúna, estado de São Paulo, Brasil), afluente do rio Tietê; (2) Bacia do rio São Francisco -17 exemplares (8 machos e 9 fêmeas) coletados no Ribeirão Araras (município de Capitólio, estado de Minas Gerais, Brasil), afluente do rio São Francisco e 10 exemplares (4 machos e 6 fêmeas) coletados no riacho Frio (município de Três Marias, estado de Minas Gerais, Brasil), também afluente do rio São Francisco (Figura 1).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células da porção anterior do rim de acordo com a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978). A heterocromatina foi localizada pela técnica de bandamento-C (Sumner 1972). A coloração pelo bandamento C foi realizada com Iodeto de Propídeo 50 µg/ ml. As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas pela técnica de nitrato de Prata (Ag-RONs), de acordo com Howell & Black (1980). A técnica de *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) foi utilizada para mapear os sítios de rDNA 18S e 5S nos cromossomos. Foram utilizadas as sondas de rDNA 18S obtida de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti 2004) e rDNA 5S isolada de *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti 1999). As sondas foram marcadas com biotina por nick translation segundo as recomendações do fabricante (Bionick labelling system -Invitrogen). A detecção do sinal foi realizada com o anticorpo Avidina FITC (Sigma). O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL sonda, 50% formamida, 2XSSC, 10% sulfato dextrano) seguiu o procedimento geral descrito por Pinkel *et al* (1986). Regiões cromossômicas GC específicas foram determinadas pelo fluorocromo cromomicina A₃ de acordo com Schmid (1980). As imagens cromossômicas foram capturadas em microscópio de epifluorescência BX51 acoplado a câmera CCD DP 71 (Olympus). As imagens fluorescentes do bandamento C foram invertidas e convertidas em escala de cinza utilizando o software Image Pro-Plus (Olympus). Os cromossomos foram classificados de acordo com a relação de braços (Levan *et al* 1964) e organizados no cariótipo em dois grupos: meta-submetacêntrico (m-sm) e subtelo-acrocêntrico (st-a).

Resultados

Todas as populações analisadas citogeneticamente apresentaram número diplóide $2n=54$ cromossomos sendo 50 meta-submetacêntricos (m-sm) e 4 subtelo-cêntricos (st) com número fundamental $FN=108$ para ambos os sexos (Figuras 2 e 3). Entretanto, os machos apresentaram 25 pares de meta-submetacêntricos e as fêmeas 24 pares meta-submetacêntricos mais um cromossomo metacêntrico pequeno e um submetacêntrico médio, ambos sem homólogos. Este par heteromórfico ocorre em 100% das células no cariótipo das fêmeas. Desta forma, o par cromossômico metacêntrico 18 corresponde aos cromossomos ZZ nos machos, e nas fêmeas este par é representado por um cromossomo Z e um cromossomo submetacêntrico W um pouco maior em tamanho relativamente ao cromossomo Z (Figuras 2 e 3).

O bandamento C evidenciou regiões heterocromáticas centroméricas na maioria dos cromossomos do complemento, além de algumas bandas terminais, com algumas pequenas diferenças entre o cariótipo dos exemplares das populações das bacias do São Francisco e do alto Paraná. [Figuras 2(b), (d), (f) e 3(b), (d), (f)]. Em todas as populações o cromossomo Z apresenta uma região heterocromática na região proximal e outra na região terminal, ambas no braço curto [Figuras 2(b), (d), (f) e 3(b), (d), (f)]. O cromossomo sexual W apresenta o braço longo praticamente todo heterocromático, com uma região heterocromática mais densa que se estende a partir da região proximal, fica menos condensada a medida que avança para a região intersticial do braço longo e torna a ser mais condensada na região terminal [Figura 3(b), (d), (f)]. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) coradas com o nitrato de Prata e confirmadas pela FISH com localização de sondas DNAr 18S demonstraram diferenças no número de marcações entre as populações estudadas de *A. ibitiensis* das bacias do alto rio Paraná e São Francisco. Em *A. ibitiensis* do ribeirão Araras e riacho

Frio (bacia do São Francisco) foram encontrados sites de Ag-RONs confirmados pela FISH com sonda de rDNA 18S na região terminal do braço longo dos pares cromossômicos 6 e 26 [Figura 4(a), (d)]. Já em *A. ibitiensis* do rio Passa Cinco, bacia do alto rio Paraná foram localizados até quatro cromossomos com sítios Ag-RONs na região terminal do braço longo [Fig. 4(e)], enquanto a FISH com sonda de rDNA 18S evidenciou 8 cromossomos com sítios na região terminal do braço longo correspondente aos 6, 14, 15 e 26 [Fig. 4(e)]. As regiões GC ricas caracterizadas pela cromomicina A₃ apresentaram sítios fluorescentes em regiões coincidentes as RONS em todas as populações estudadas [Fig. 4(f), (g)]. A FISH com sonda de DNAr 5S revelou apenas um par cromossômico marcado, na região pericentromérica do braço curto do par 9 em todos os citótipos analisados [Fig. 4(c)].

Discussão

A família Parodontidae é caracterizada citogeneticamente por apresentar $2n=54$ cromossomos e inúmeras divergências em marcadores cromossômicos. Algumas espécies são homomórficas em relação a presença de cromossomos sexuais ao lado de outras que possuem sistemas heteromórficos ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂ (Tabela I). As espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *A. vladii* e *Apareiodon* sp. do rio Verde (bacia do alto rio Tibagi) apresentam sistema de cromossomos sexuais simples com heterogametia feminina ZZ/ZW. Outras espécies de Parodontidae já estudadas citogeneticamente não apresentaram sistemas heteromórficos de cromossomos sexuais, entre elas *P. nasus*, *P. pongoensis*, *A. piracicabae*, *A. vitattus* e *A. ibitiensis* (Moreira-Filho et al 1984, 1985; Jesus & Moreira-Filho 2000, Vicente et al 2001; Centofante et al 2002; Bellafronte et al 2005).

A localização da heterocromatina constitutiva mostrou blocos nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos do complemento, blocos terminais em um grande número de cromossomos, além de blocos adjacentes as RONS como também demonstrado em várias outras espécies de Parodontidae (Jesus & Moreira-Filho 2000, Vicente et al 2001; Centofante et al 2002; Vicente et al 2003; Bellafronte et al 2005; Rosa et al 2006; Vicari et al 2006). As três populações de *A. ibitiensis* estudadas, rio Passa Cinco, ribeirão Araras e riacho Frio apresentaram um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW por heteromorfismo da região heterocromática proximal ao centrômero do par 18 nestas populações. Marcadamente o cromossomo W sofreu um processo de heterocromatinização e acúmulo de sequências repetitivas na diferenciação em relação ao cromossomo Z. A heterocromatinização e acúmulo de sequências no W ocorreram a partir de uma pequena região heterocromática proximal do braço curto presente no cromossomo Z, a qual, no cromossomo W diferenciado é maior e corresponde ao braço longo deste cromossomo. Esta hipótese de diferenciação é a mesma utilizada para explicar os cromossomos sexuais ZZ/ZW de *P. moreirai*, *P. hilarii*, *A. vladii*, e *Apareiodon* sp. do rio Verde (Centofante et al 2002; Vicente et al 2003; Rosa et al 2006; Vicari et al 2006).

Em Parodontidae o acúmulo de DNA repetitivo do cromossomo W constitui um passo decisivo na diferenciação do cromossomo W, seguido por modificações estruturais no cromossomo Z e W. Dessa forma, os cromossomos sexuais Z e W estariam modificando em forma e tamanho entre as populações/espécies de Parodontidae de acordo com o modelo clássico proposto para a evolução de cromossomos sexuais heteromórficos (Muller 1964; Charlesworth 1978; Green 1990).

Uma espécie de Parodontidae estudada citogeneticamente por Vicari et al (2006) foi identificada provisoriamente por especialistas como *Apareiodon* sp. proveniente do rio Verde (alto rio Tibagi; bacia do alto rio Paraná). Na época, Pavanelli CS (comunicação pessoal), relatou que esta população possui características morfológicas muito semelhantes as de *A. ibitiensis*, porém podiam ser diferenciadas por caracteres cromossômicos como àqueles descritos por Vicari et al (2006), principalmente em relação a presença de um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW em *Apareiodon* sp. O presente trabalho apresenta uma análise cariotípica para três populações distintas de *A. ibitiensis*, pertencentes às bacias hidrográficas do alto rio Paraná e São Francisco. Estas três populações apresentaram sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, identificado tanto por diferenças morfológicas quanto de localização da heterocromatina, muito semelhante ao verificado por Vicari et al. (2006) em *Apareiodon* sp. O emprego da coloração das heterocromatinas destacadas pelo bandeamento c com corante fluorescente iodeto de propídio permitiu um melhor contraste das bandas cromossômicas e, conseqüentemente, uma maior resolução na determinação do tamanho e posição dos blocos heterocromáticos. Dessa forma, este método viabilizou diagnosticar o heteromorfismo da região heterocromática nos cromossomos sexuais Z e W também para a espécie *A. ibitiensis* nas populações estudadas. Assim, muito provavelmente *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp. do rio verde trata-se de um único taxa, que apresenta $2n=54$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW em estágios divergentes de diferenciação do cromossomo W, uma vez que *Apareiodon* sp. apresenta um cromossomo W maior, subtelocêntrico, devido a uma maior amplificação e acúmulo de heterocromatina como variação geográfica (Figura 5).

Outras famílias de Characiformes Neotropicais também apresentam representantes com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ao lado de espécies não diferenciadas (Galetti Jr. & Foresti 1986; Bertollo et al 2000; Vicari et al 2008). Situação semelhante ao que ocorre em relação ao sistema ZW de Parodontidae foi visualizada na família Crenuchidae por Vicari et al (2008). As espécies de Crenuchidae *Characidium gomesi* e *Characidium alipioi* estudadas citogeneticamente apresentam sistema de cromossomos sexuais ZW, as quais detêm uma provável origem comum, mas estão em estágios interpopulacionais e interespecíficos diferenciados da diversificação de seus cromossomos Z e W (Vicari et al 2008). Em Parodontidae, as espécies *P. moreirai* (Centofante et al 2002); *P. hilarii* (Vicente et al., 2003); *A. vladii* (Rosa et al 2006) e; *Apareidon* sp. da bacia do alto rio Tibagi (Vicari et al 2006) apresentam uma provável origem comum para o sistema de cromossomos sexuais ZW. Assim, estas espécies formariam um grupo derivado em relação aos demais Parodontidae não sustentada pela sua separação em gêneros *Parodon* e *Apareidon* (Vicari et al 2006). Da mesma forma que em *Characidium* estas espécies de Parodontidae estão em estágios evolutivos diferentes da diferenciação dos cromossomos Z e W. Assim, as populações de *A. ibitiensis* das bacias do São Francisco e alto rio Paraná aqui estudadas teriam um menor acúmulo de DNA repetitivo no braço longo do cromossomo W. Ainda, a população denominada *Apareidon* sp. da bacia do alto rio Tibagi trata-se, possivelmente, da espécie *A. ibitiensis*. No entanto, esta população de *A. ibitiensis* distribuída mais ao sul do continente sul-americano do que aquelas do presente estudo apresenta um cromossomo W maior, com maior acúmulo de DNA repetitivo. Populações de *Characidium gomesi* isoladas geograficamente também apresentaram estágios

diferentes de diferenciação de seus cromossomos sexuais ZW (Vicari et al 2008). Assim, populações de *Apareidon ibitiensis* apresentam divergências citogenéticas interpopulacionais em consequência de seus isolamentos geográficos reprodutivos como proposto, de modo geral, para a diversificação cariotípica de peixes neotropicais por Artoni et al. (2009).

A localização e mapeamento da dispersão dos rDNA por FISH tem sido outro marcador cromossômico utilizado no estudo da diversificação genômica em Parodontidae. A localização dos sítios de rDNA 18S por FISH foi verificada na região terminal do braço longo de um par cromossômico subtelocêntrico em *Parodon nasus*, *P. hilarii*, *P. pongoensis*, *Apareiodon moreirai*, *A. vladii* e *Apareiodon* sp. do alto rio Tibagi (Vicente et al 2001, Centofante et al 2002, Rosa et al 2006, Vicari et al 2006) geralmente coincidentes com regiões GC ricas (Bellafronte et al 2005; Vicari et al 2006). Apesar da aparente constância, polimorfismo de RONS tem sido detectado em *A. piracicabae* da bacia do alto rio Paraná e em *A. affinis* da bacia do baixo rio Paraná, Argentina (Moreira-Filho et al 1984; Jesus & Moreira-Filho 2000a; Jorge & Moreira-Filho 2000; 2004). Nas populações de *A. ibitiensis* da bacia do rio São Francisco aqui estudadas foram encontrados dois pares cromossômicos com sítios de RONS detectados por nitrato de prata e FISH com sondas de rDNA 18S. Já a população de *A. ibitiensis* da bacia do alto rio Paraná apresentou quatro pares cromossômicos com sítios de RONS. No entanto, estas populações mantiveram o sítio de rDNA terminal em um par de cromossomos subtelocêntricos, comumente encontrado nos Parodontidae. Eventos de dispersão devem ter originado os sítios adicionais de rDNA 18S nas populações de *A. ibitiensis*. Moreira-Filho et al (1984) considera que as RONS associadas à heterocromatina terminal estão mais propensas a rearranjos cromossômicos e,

consequentemente, sua dispersão pelo genoma. Diferenças interpopulacionais em relação a presença de múltiplos sítios de RONS é uma condição verificada para algumas espécies de peixes Neotropicais, geralmente devido ao isolamento reprodutivo, como descrito para populações de *Hoplias malabaricus* (citótipo A) de quatro populações distintas (Vicari et al 2005).

As análises da localização dos sítios ribossomais 5S por FISH nas três populações de *A. ibitiensis* objeto desta análise mostraram um par metacêntrico de tamanho médio marcado com sítios pericentroméricos no braço curto. Apenas um par metacêntrico com sítios 5S comparáveis a este também foi detectado nas espécies *P. moreirai* e *Apareiodon* sp. do alto rio Tibagi (Centofante et al 2002, Vicari et al 2006, respectivamente). Nas espécies *P. hilarii*, *P. pongoensis* e *Apareiodon vladii*, além deste par metacêntrico comparável com sítio de rDNA 5S, também foram encontrados sítios 5S adicionais (Vicente et al 2001, Rosa et al 2006). Já em *P. nasus*, um cístron de rDNA 5S é sintênico ao DNAr 18S, situação não detectada em nenhum outro Parodontidae, além da presença de sítios adicionais (Vicente et al 2001; Bellafronte et al 2005). Em *A. affinis* do baixo rio Paraná o sítio de rDNA 5S foi localizado em um par cromossômico heteromórfico (Jorge & Moreira-Filho 2004). Desta forma, as populações de *A. ibitiensis* estudadas das bacias do São Francisco e alto rio Paraná compartilham a ocorrência do par metacêntrico portador de sítios rDNA 5S. No entanto, em relação ao marcador de rDNA 18S diferenças interpopulacionais importantes foram detectadas.

Até agora, o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW não era descrito para populações de *A. ibitiensis* (Moreira-Filho et al 1984; 1985; Jesus & Moreira-Filho 2000). No presente estudo, com a utilização de um método de coloração mais

resolutivo para o bandamento C foi possível detectar o heteromorfismo de cromossomos sexuais em diferentes populações de *A. ibitiensis* das bacias do rio São Francisco e alto rio Paraná. Da mesma forma, é possível inferir que a população descrita como *Apareidon* sp. para o alto rio Tibagi por Vicari et al (2006) deve se tratar de *A. ibitiensis* em estágio de diferenciação maior para o cromossomo W. Ainda, nossos resultados corroboram a hipótese de uma provável origem comum para o sistema de cromossomos sexuais em Parodontidae descrita por Vicari et al (2006). Não obstante, os resultados mostram que populações de *A. ibitiensis* de bacias hidrográficas distintas detêm divergências interpopulacionais em relação ao estágio de diferenciação do cromossomo sexual W e número de sítios de DNA ribossômico.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 08/54620-1), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938).

Referências Bibliográficas – Final da tese.

Tabela I – Sistema de cromossomos sexuais descritos em espécies Parodontidae.

Espécies	Bacia Hidrográfica	2n	Fórmula cariotípica	Sistema sexual	Localização DNAr 18S	Localização DNAr 5S	Ref.
<i>P. hilarii</i>	Rio São	54 m	54m-sm	ZZ	Par 15	Pairs 11(sm),	2, 5, e 7
	Francisco	54 f	53m-sm, 1st	ZW	(sm)	19 (sm)	
<i>P. moreirai</i>	Alto Rio Paraná	54 m	54m-sm	ZZ	Par 15	one pair	8
		54 f	54m-sm	ZW	(sm)	(sm)	
<i>A. vladii</i>	Alto Rio Paraná	54 m	50m-sm, 4st	ZZ	Par 26	Pairs 2 (m),	9
		54 f	50m-sm, 4st	ZW	(st)	7 (sm)	
<i>A. ibitiensis</i>	Alto Rio Paraná	54 m	50m-sm, 4st	ZZ	Pares 6 (sm), 14	Pair 9	Presente estudo
		54 f	50m-sm, 4st	ZW	(m), 15 (m), 26 (st)	(sm)	
<i>A. ibitiensis</i>	Rio São	54 m	50m-sm, 4st	ZZ	Pares 6 (sm),	Pair 9	Presente estudo
	Francisco	54 f	50m-sm, 4st	ZW	26 (st)	(sm)	
<i>Apareiodon</i> sp.	Alto Rio Paraná	54 m	48m-sm, 6st	ZZ	Par 25	one pair	10
		54 f	48m-sm, 6st	ZW	(st)	(sm)	
<i>A. affinis</i>	Alto Rio Paraná	54 m	50m-sm, 4st	ZZ	-	-	1, 3, e 4
		55 f	51m-sm, 4st	ZW ₁ W ₂			

Referências: 1 - Moreira-Filho et al. (1980); 2- Moreira-Filho et al. (1993); 3 - Jesus et al 1999; 4- Jesus e Moreira-Filho (2000a); 5- Jesus e Moreira-Filho (2000b); 6- Jorge e Moreira-Filho (2000); 7- Vicente et al (2001); 8- Centofante et al. (2002); 9- Rosa et al. (2006); 10- Vicari et al. (2006).

m= macho; f= fêmea; Ref.= referências

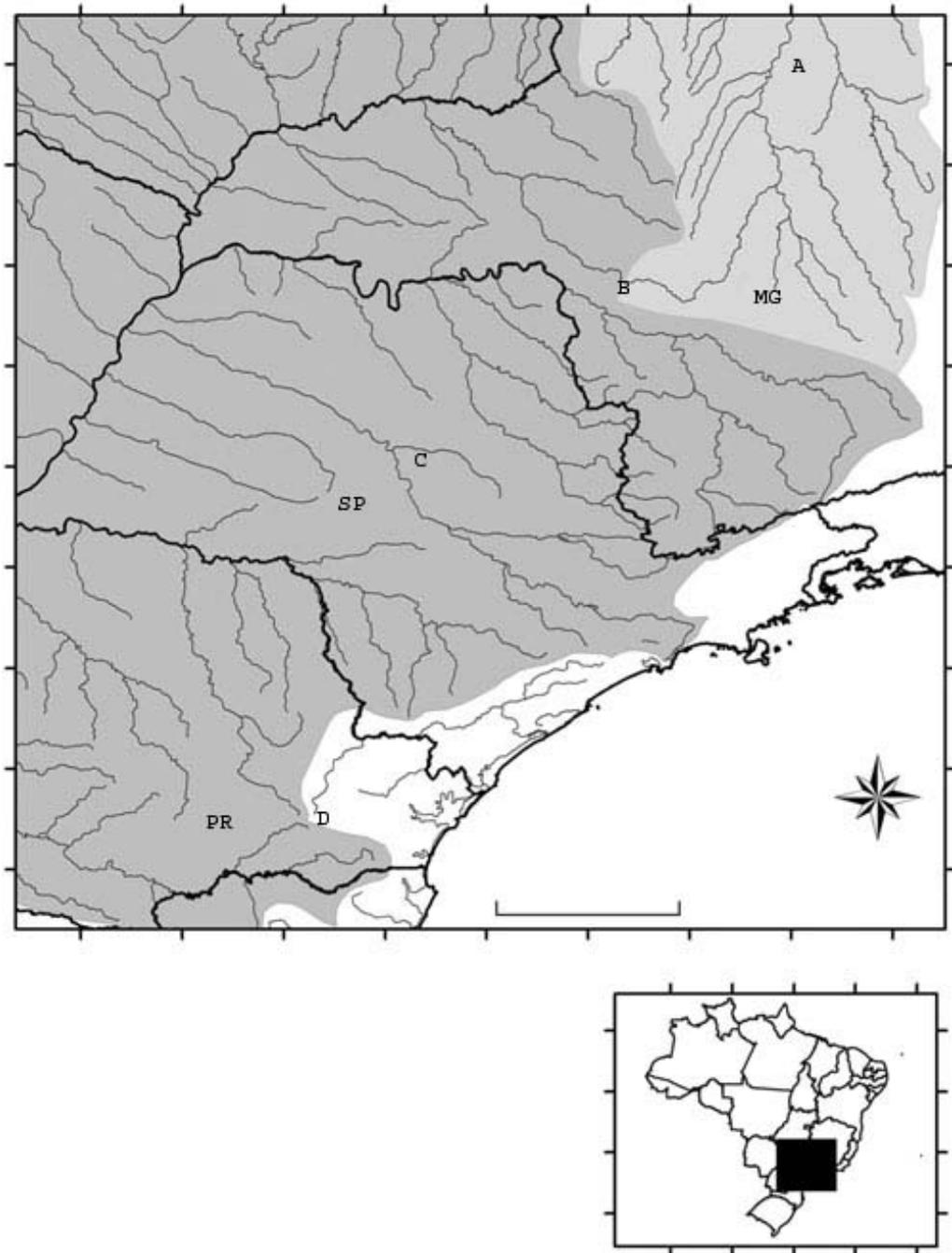


Figura 1 - Locais de coleta de *Apareiodon ibitiensis*: (A) Riacho Frio e (B) Ribeirão Araras (Bacia do rio São Francisco) e (C) rio Passa Cinco (Bacia do Alto rio Paraná). (D) *Apareiodon* SP. Foi coletado no rio Verde (Alto rio Tibagi) (Vicari et al 2006).

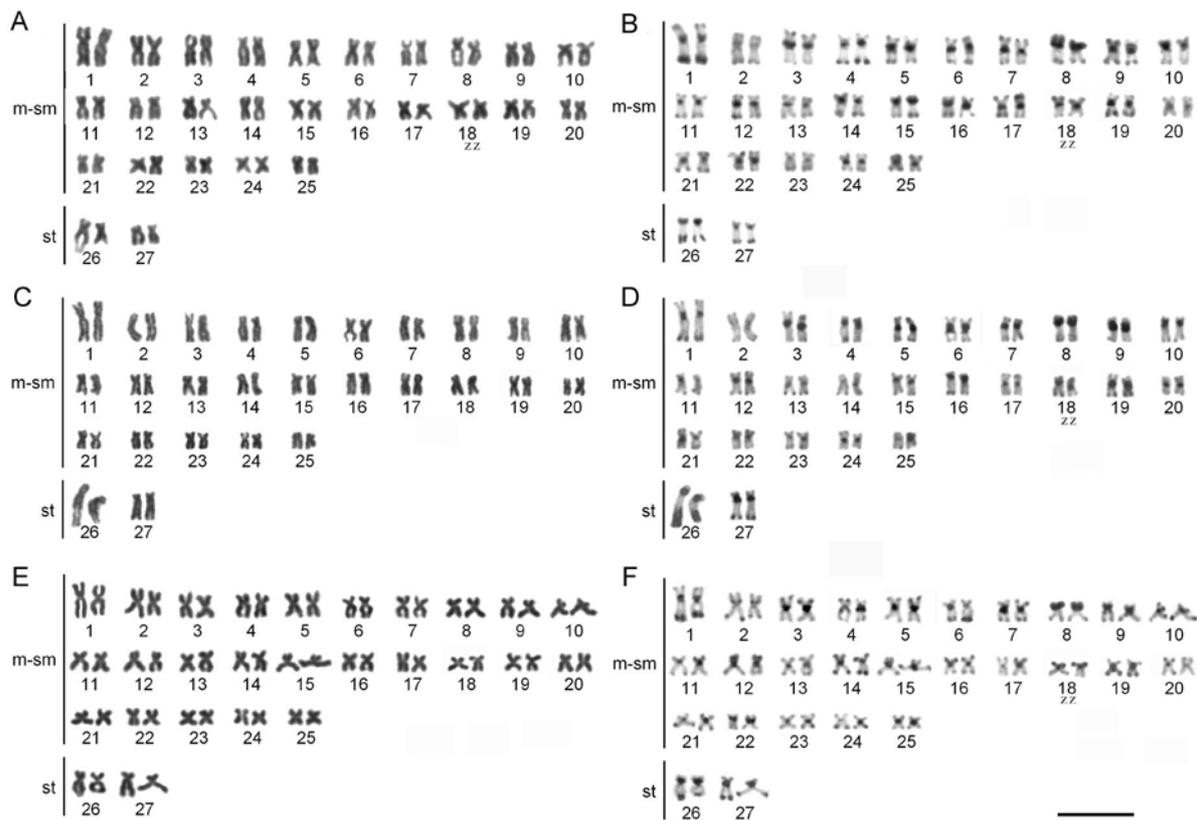


Figura 2 - Cariótipos de machos de *Apareiodon ibitiensis* corados por Giemsa (a, c, e) e C bandado (b, d, f). (a, b) cariótipos da população do riacho Frio. (c, d) cariótipos da população do ribeirão Araras. (e, f) cariótipos da população do rio Passa Cinco. Bar = 10 μ m.

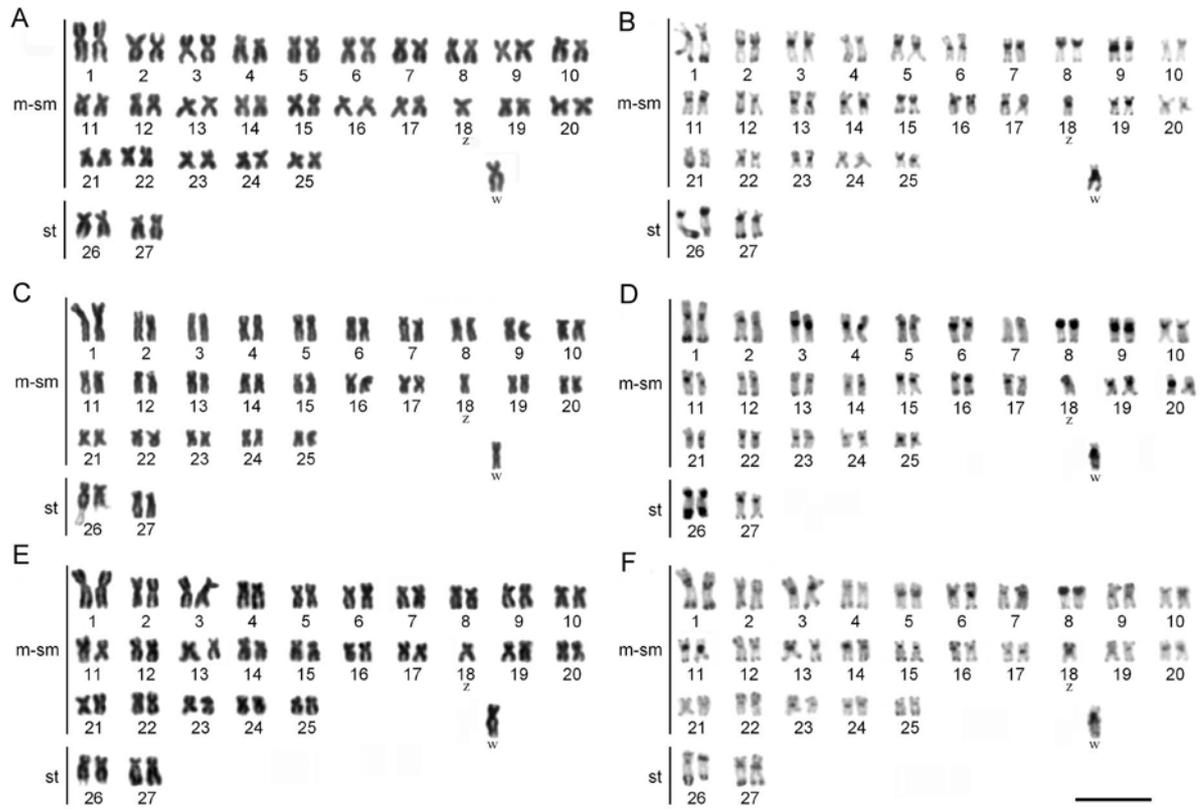


Figura 3 - Cariótipos de fêmeas de *Apareiodon ibitiensis* corados por Giemsa (a, c, e) e C bandados (b, d, f). (a, b) cariótipos da população do riacho Frio. (c, d) cariótipos da população do ribeirão Araras. (e, f) cariótipos da população do rio Passa Cinco. Bar = 10 μm.

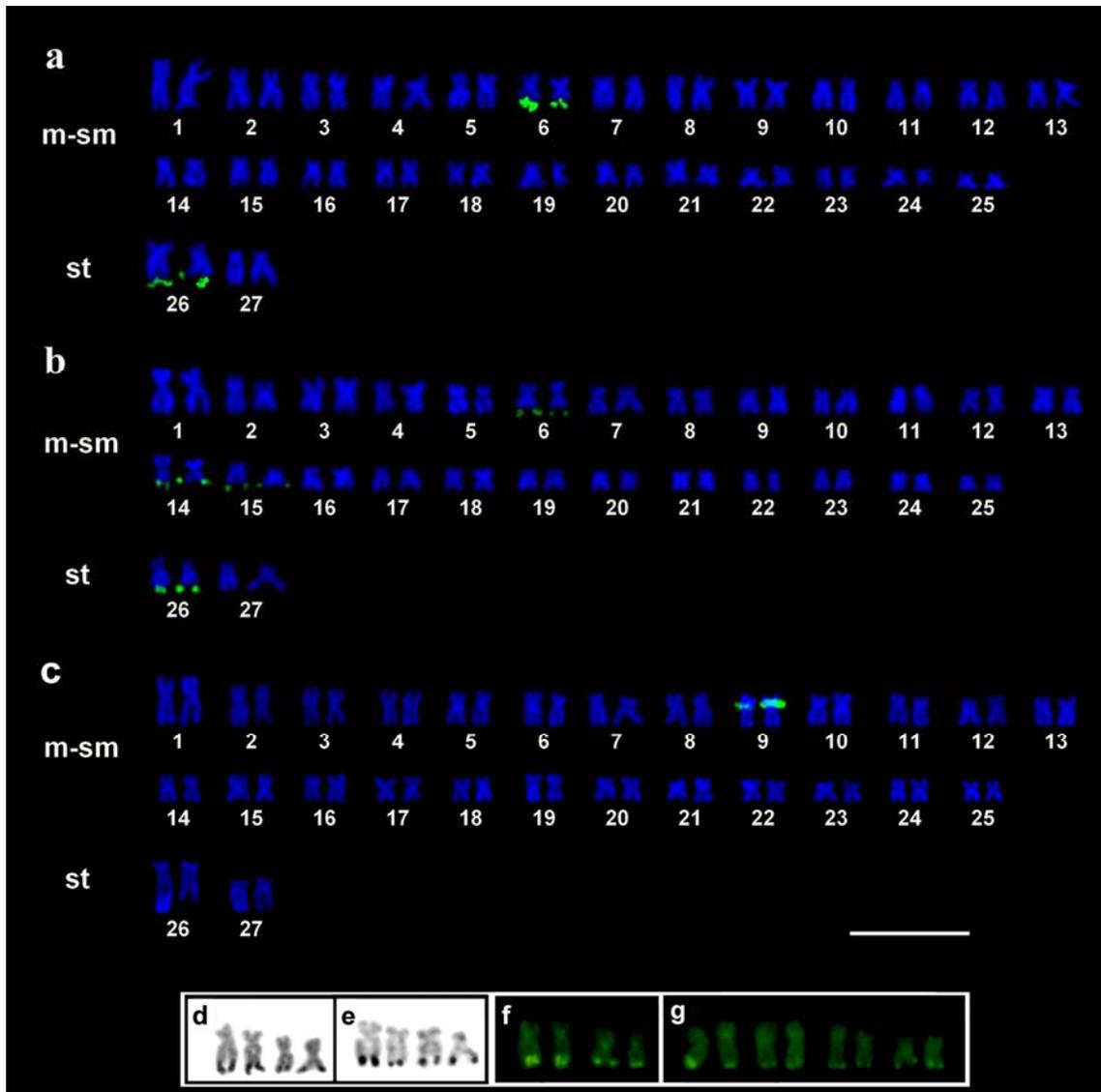


Figura 4 - Marcadores cromossômicos em *Apareiodon ibitiensis*. (a) Representa o cariótipo das populações da bacia do rio São Francisco mostrando quatro sítios de DNAr 18S. (b) Cariótipo do rio Passa Cinco, bacia do Alto Paraná mostrando oito sítios de DNAr 18S. (c) Representa o cariótipo de *A. ibitiensis* mostrando o sítio de DNAr 5S no par cromossômico 9. (d, e) Impregnação por Ag-RON na bacia do rio São Francisco e Alto Paraná respectivamente. (f, g) cromomicina A3 na bacia do rio São Francisco e Alto Paraná respectivamente.. Bar = 10.

Capítulo 2 - Marcadores cromossômicos e inferências filogenéticas entre os Parodontidae

Resumo

Os DNAs satélites têm importante papel na evolução do genoma dos eucariotos. A análise molecular das seqüências repetitivas dos DNAs satélites e seu mapeamento físico nos cromossomos de diferentes espécies de um mesmo grupo podem ser utilizados em inferências de divergência evolutiva e agrupamento cladístico. A família Parodontidae tem taxonomia confusa, e muitos são os questionamentos sobre o real agrupamento das espécies nos gêneros desta família. No presente estudo, os rDNAs e o DNA satélite pPh2004 foram mapeados por hibridação *in situ* fluorescente sobre os cromossomos de algumas espécies de Parodontidae, e analisados em conjunto com outros marcadores cromossômicos com intuito de verificar a diversificação dos genomas na família, e propor, baseado em marcadores cromossômicos, grupos de espécies mais estritamente relacionadas. Esta análise mostrou que os marcadores cromossômicos de localização dos sítios de rDNA, presença/ausência de sistemas de cromossomos sexuais e compartilhamento do DNA satélite pPh2004 puderam auxiliar o entendimento da evolução dos genomas e inferir sobre agrupamento filogenético na família Parodontidae.

Palavras-chave: DNA satélite, DNAr 18S, DNAr 5S, cromossomos sexuais.

Introdução

O genoma dos eucariotos é em grande parte composto por DNAs repetitivos e não codificantes, que podem ocupar mais que 50% da sua totalidade (Singer 1982).

Geralmente, os clusters de DNA satélite, em eucariotos, estão abrigados nas regiões heterocromáticas dos cromossomos (Ugarkovic & Plohl 2002), na maioria das vezes em regiões pericentroméricas e/ou terminais (Pardue 1975, Charlesworth et al 1994).

A dinâmica evolutiva destes DNAs satélites é extremamente variável, e pode fornecer informações úteis tanto para estudos microevolutivos (DNA satélites espécie-específico), como marcadores para estudos filogenéticos (DNA satélites compartilhados) (Cabrero et al 2003). Existem ainda exemplos de famílias de DNA satélite com taxa de evolução lenta, permanecendo conservadas ao longo do tempo, refletindo em homogeneização das sequências (De La Herrán et al 2001). Em peixes, sequência de DNA satélite cromossomo-específica ou região-específica do cromossomo pode tornar-se um marcador citogenético útil (Saito et al 2007), aplicado algumas vezes para compreender as relações filogenéticas entre diferentes táxons (De La Herrán et al 2001, Saito et al 2007, Vicari et al 2009), verificar a citotaxonomia em complexos de espécies (Mantovani et al 2004, Kantek et al 2009), propor as prováveis origens dos cromossomos supranumerários (Mestriner et al 2000, Jesus et al 2003, Artoni et al 2006) e caracterizar cromossomos sexuais (Devlin et al 2001, Vicari et al 2009).

A família Parodontidae inclui um grupo de peixes encontrados nos rios da América do Sul (Roberts 1974). Esta família é composta por três gêneros sustentados por poucos e sutis caracteres morfológicos: *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*. Recentemente, Ingenito (2008) realizou uma análise filogenética utilizando o método da máxima parcimônia para caracteres osteológicos e morfológicos, onde não encontrou evidências filogenéticas que sustentassem a manutenção do gênero *Apareiodon*, o qual passa a considerar sinônimo júnior de *Parodon*. Assim, o gênero

Parodon, em sua nova possível delimitação, é sustentado por pelo menos nove sinapomorfias exclusivas dentro de Parodontidae.

Estudos citogenéticos dos Parodontidae revelam que, embora apresentem um número diplóide predominante de $2n = 54$, estes apresentam uma macroestrutura cariotípica e uma estrutura genômica diversificada, incluindo a presença de diferentes sistemas de cromossomos sexuais (Moreira-Filho et al 1980, Jesus & Moreira-Filho 2000a, Vicari et al 2006, Rosa et al 2006), polimorfismo estrutural (Jorge & Moreira-Filho 2000 e 2004) e variações interespecíficas de número e posição das regiões organizadoras de nucléolo nos cromossomos (Moreira-Filho et al 1984). A primeira descrição de um DNA satélite em Parodontidae foi realizada por Vicente et al (2003), denominado DNA satélite pPh2004, isolado de *Parodon hilarii* por digestão genômica pela enzima Eco RI, identificado como uma seqüência monomérica de 200pb e 60% rica em bases A-T. A hibridação *in situ* fluorescente com o satélite pPh2004 evidenciou sítios em *P. hilarii* (Vicente et al 2003) e em *Parodon moreirai*, citado como *Parodon* sp. (Centofante et al 2002).

Diante do exposto o presente estudo teve como objetivo verificar a diversificação dos marcadores cromossômicos convencionais e possível atuação dos marcadores de rDNA e DNA satélite pPH2004 na diversificação do genoma de algumas espécies de Parodontidae e as possíveis relações filogenéticas entre essas espécies.

Material e Métodos

No presente estudo, foram analisados citogeneticamente diferentes espécies da família Parodontidae (Tabela I). As metáfases mitóticas foram obtidas através do

método direto descrito por Bertollo et al (1978), a heterocromatina foi analisada pela técnica de bandamento-C (Sumner 1972), e as regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas pela impregnação pelo íon prata (Ag-NORs), de acordo com Howell e Black (1980). Para a localização cromossômica dos sítios dos rDNAs 18S e 5S e do DNA satélite pPh2004, foi realizada a técnica de fluorescent *in situ* hibridization (FISH). Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S obtida de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004), uma sonda de rDNA 5S de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999) e uma sonda do DNA satélite pPh2004 de *P. hilarii* (Vicente et al 2003). As sondas foram marcadas por reações de *nick translation* com biotín 16-dUTP (Biotin Nick Translation mix - Roche); e/ou digoxigenin 11-dUTP (Dig-Nick Translation mix - Roche) segundo as instruções do fabricante. Para o reconhecimento e amplificação do sinal foram utilizados os anticorpos avidina-FITC, anti-avidina biotínilada (Sigma) e anti-digoxigenina rodamina (Roche). O procedimento de hibridação seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al (1986), sob condição de alta estrigência (2,5 ng/ μ L de sonda, 50% de formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2XSSC a 37°C por 18 horas). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (2 μ g/mL) ou iodeto de propídeo (1.5 μ g/mL), ambos em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50 acoplado a câmera CCD DP 71 (Olympus). Para a captura das imagens foi utilizado o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

Os cromossomos foram organizados e arrançados em decréscimo de tamanho nos cariótipos segundo a proposta de Levan et al. (1964). Para a montagem dos idiogramas representativos dos cariótipos das espécies *A. affinis*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P.*

pongoensis com base nos marcadores cromossômicos de bandamento C e FISH com sondas de rDNAs 18S e 5S, e do DNA satélite pPh2004 foram utilizados dados de trabalhos de descrição citogenética destas espécies (Jesus & Moreira-Filho 2000a, b; Vicente et al 2001; Centofante et al 2002; Vicente et al 2003; Bellafronte et al 2005; Rosa et al., 2006; Vicari et al 2006) e do presente estudo.

Resultados

Todas as espécies de Parodontidae analisadas apresentaram $2n=54$ cromossomos, com exceção de *A. affinis* que apresenta $2n=54$ cromossomos para machos e $2n=55$ cromossomos para fêmeas (Figura 1). As espécies *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *P. nasus* e *P. pongoensis* são cromossomicamente homomórficas em relação ao sexo (Figuras 1 e 4). Por sua vez, as espécies *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *P. moreirai* e *P. hilarii* apresentam um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW heteromórfico enquanto *A. affinis* apresenta um sistema múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ (Figuras 1 e 4).

A técnica de bandamento C evidenciou bandas pericentroméricas e terminais em vários cromossomos do complemento das espécies *A. affinis*, *A. ibitiensis*, *A. piracicabae* e *A. vittatus* (Figura 1), assim como também descrito para as espécies *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Figura 4). *Apareiodon affinis* apresentou blocos de heterocromatina em região pericentromérica e em regiões terminais de ambos os braços do cromossomo Z. O cromossomo W₁ apresenta um bloco heterocromático em região pericentromérica e uma banda mais conspícua na região terminal do braço longo. Por sua vez, o cromossomo W₂ apresenta uma banda heterocromática conspícua em região terminal ao braço curto

(Figura 1a). Para as espécies que apresentam sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *P. moreirai* e *P. hilarii* o cromossomo Z apresenta um pequeno bloco heterocromático proximal e outro terminal para o braço curto. Já o cromossomo W possui uma amplificação da região heterocromática da região proximal presente no Z, transformando em braço maior. (Figura 4).

A utilização da sonda de rDNA 18S e do nitrato de prata sobre os cromossomos localizou sítios positivos em região terminal de um par subtelocêntrico (par 26) em *A. affinis* (Figura 2b e figura 4a). Em *Apareiodon ibitiensis* da bacia do rio São Francisco foram encontrados quatro cromossomos marcados, tanto por Ag-RONs quanto pela FISH, localizados nos pares cromossômicos 6 e 26 (Figura 2d e figura 4b). Já em *A. ibitiensis* do alto rio Paraná, quatro cromossomos foram marcados com Ag-RONs e oito cromossomos foram evidenciados pela FISH, localizados nos pares 6, 14, 15 e 26 (Box da figura 2 e figura 4c). *Apareiodon piracicabae* e *Apareiodon vittatus* apresentaram sítios do rDNA 18S no par 27 (Figuras 2g e 4f; figuras 2h, 2i e 4g respectivamente), entretanto alguns indivíduos de *A. vittatus* obtiveram um sítio adicional no par 14 (Figura 2i e figura 4h). Em *P. pongoensis* os sítios para o rDNA 18S foram observados no par 2 (Figuras 2j, 4m). Ainda, no idiograma é possível visualizar a localização dos sítios de rDNA 18S no par st 25 em *Apareiodon* sp., st 26 em *A. vladii*, m 15 em *P. moreirai*, m 16 em *P. hilarii*; e no par st 25 da espécie *P. nasus* (Figuras 4d, 4e, 4i, 4j, 4l respectivamente).

A FISH com sonda de rDNA 5S foi localizada em região proximal do braço curto no par m 8 em *A. affinis*; no par m 9 em *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vittatus* e *P. pongoensis* (Figuras 2 e 4). Por sua vez, no idiograma é representada a localização do rDNA 5S no par m 11 de *Apareiodon* sp., nos pares m 2 e 7 de *A. vladii*, m 18 em *P.*

moreirai, m 11 em *P. hilarii* e no par st 25 de *P. nasus* (Figuras 4d, 4e, 4i, 4j, 4l respectivamente).

A FISH com a sonda pPh2004 não evidenciou sítios deste DNA satélite nos cromossomos das espécies *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *A. piracicabae* e *A. vittatus* (dados não mostrados). Já as espécies *A. affinis*, *P. nasus*, *P. pongoensis*, *P. moreirai* e *P. hilarii* apresentaram sítios de hibridação positivos com a sonda pPh2004 (Figura 3 e 4). Na espécie *A. affinis*, o par metacêntrico 2 apresentou sítios pPh2004 nas regiões terminais de ambos os braços, além de outro par metacêntrico (par 13) com marcação terminal no braço longo (Figuras 3a, 4a). Em *P. nasus* foram detectadas marcações pPh2004 em quatro pares cromossômicos: nas regiões terminais do braço longo dos pares 6, 13, 26 e 27; e na região intersticial do braço longo do par metacêntrico 6 (Figuras 3b, 4l). *P. pongoensis* mostrou apenas um par metacêntrico (par 13) com marcações pPh2004 em região terminal do braço longo (Figuras 3c, 4m). No idiograma é verificado que o DNA satélite pPh2004 está localizado na região terminal do braço longo do cromossomo Z e terminal do braço curto do cromossomo W nas espécies *P. moreirai* e *P. hilarii*, além de 4 sítios adicionais em *P. moreirai* e 16 em *P. hilarii* (Figuras 4i, 4j).

Discussão

A família Parodontidae tem taxonomia confusa, e muitos são os questionamentos sobre o real agrupamento das espécies nos gêneros desta família. Ingenito (2008) considerou o gênero *Apareiodon* sinônimo júnior de *Parodon*. Citogeneticamente, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* possuem características macrocariotípicas muito semelhantes: o número diplóide é de 54 cromossomos compostos

basicamente por cromossomos meta-submetacêntricos (exceção de populações de *A. affinis*), e presença de heterocromatina centromérica em praticamente todos os cromossomos do complemento e algumas heterocromatinas terminais (Moreira-Filho et al 1984, Jesus & Moreira-Filho 2000a, Centofante et al 2002, Vicente et al 2003, Bellafronte et al 2005, Vicari et al 2006). No entanto, algumas características cromossômicas não são compartilhadas por todos representantes da família. Entre estas estão a localização dos sítios ribossomais, a ocorrência de heteromorfismos de cromossomos sexuais e a presença do DNA satélite pPh2004. Estes marcadores cromossômicos compartilhados por apenas algumas das espécies poderiam auxiliar na interpretação das relações filogenéticas entre os Parodontidae.

Em relação aos DNAs ribossômicos, os sítios detectados por Ag-RONs e sonda de rDNA 18S estão localizados na região telomérica do braço longo de um grande par cromossômico subtelocêntrico de todas as espécies de *Apareiodon* já estudadas (Jesus e Moreira-Filho, 2000; Jorge e Moreira-Filho 2004, Rosa et al 2006, Vicari et al 2006). Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie-específicos, localizados tanto em cromossomos subtelocêntricos, como em cromossomos submetacêntricos (Vicente et al 2001; Centofante et al 2002; Bellafronte et al 2005). Em Anostomidae, grupo irmão de Parodontidae, o sítio das RONS se localiza, na maioria das espécies, em região terminal de um par meta/submetacêntrico (Galetti et al 1991). Essa condição é similar ao encontrado para as espécies do gênero *Parodon*, com exceção de *P. nasus* e todas as espécies de *Apareiodon* estudadas, as quais apresentam sítios de rDNA 18S possivelmente em localização derivada para este marcador na família Parodontidae.

A ocorrência de sítios de rDNA 18S adicionais àqueles encontrados no par subtelocêntrico, como visualizado neste estudo em *A. vittatus* e *A. ibitiensis*, podem ter sido originados por eventos de dispersão das RONS por transposições ou associações com movimentação da heterocromatina (Moreira-Filho et al 1984, Schweizer e Loid 1987, Vicari et al 2008). No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima à região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos (Centofante et al 2002, Vicari et al 2006), marcação que é homeóloga a encontrada em um par cromossômico da família Anostomidae (Martins, et al., 1999). Entretanto, sítios adicionais com localizações variáveis podem ocorrer em algumas espécies do gênero *Parodon*, além da provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com a heterocromatina GC-rica em alguns representantes da família (Vicente et al 2001, Bellafronte et al 2005, Vicari et al 2006). Diante destes dados, é possível inferir que a sintenia rDNA 18S e 5S é um caráter apomórfico para *P. nasus* gerada por um evento de rearranjo cromossômico do tipo translocação.

Dois sistemas de cromossomos sexuais distintos foram descritos em Parodontidae. A espécie *A. affinis*, do alto Paraná, apresenta um sistema de cromossomos sexuais múltiplos com heterogametia feminina, do tipo ZZ/ZW₁W₂ (Moreira-Filho et al 1980, Jesus et al 1999, Jorge & Moreira-Filho 2000). Por sua vez, nas espécies *P. hilarii*, *P. moreirai* (citado como *Parodon* sp. por Centofante et al 2002), *A. vladii* (citado como *Apareiodon* sp. por Rosa et al 2006), uma espécie de *Apareiodon* ainda não descrita (*Apareiodon* sp.), e *Apareiodon ibitiensis* ocorre um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW (Moreira-Filho et al 1993, Jesus & Moreira-Filho 2000a, Centofante et al 2002, Vicente et al 2003, Rosa et al 2006, Vicari

et al 2006, Bellafronte et al 2009; Vicari et al in press). Assim, enquanto em alguns dos Parodontidae não foi observado nenhum heteromorfismo de cromossomos sexuais, as espécies que apresentam cromossomos sexuais diferenciados poderiam estar mais relacionadas filogeneticamente. Diante destas condições Vicari et al (2006) consideraram que se o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW presentes em duas espécies de *Parodon* e em três de *Apareiodon* detém uma origem comum, a separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, em sua atual delimitação, não poderia refletir a realidade, e que as quatro espécies detentoras de tal sistema poderiam formar um clado diferenciado em Parodontidae. No entanto, os mesmos autores ainda inferem a possibilidade do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW ser resultado de uma homoplasia para estes gêneros.

Em muitas espécies de Coleoptera, Orthoptera, entre outros, onde há uma diversificação de sistemas de cromossomos sexuais, as ocorrências de sistemas múltiplos são obrigatoriamente derivados de sistemas de cromossomos sexuais simples (White 1973, Smith e Virkk 1978, Schneider et al 2006). No entanto, em Parodontidae não existem evidências que o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* possa ser derivado do sistema simples ZZ/ZW. Nas cinco espécies de Parodontidae que apresentam o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, o cromossomo Z é um meta/submetacêntrico médio em tamanho, com um bloco heterocromático proximal do braço longo, que amplificou em tamanho para diferenciar o cromossomo W (Centofante et al 2002, Vicente et al 2003, Rosa et al 2006, Vicari et al 2006, Bellafronte et al 2009, Vicari et al in press). Por sua vez, os cromossomos W₁ e W₂ são possivelmente derivados de um processo de fissão cêntrica relacionado ao cromossomo 1 (Z) do cariótipo, seguido de inversão

pericêntrica (Moreira-Filho et al 1980, Jesus et al 1999, Jorge & Moreira-Filho 2000). Diante da falta de homologia entre os sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae, não é possível afirmar que estas seis espécies (*A. affinis*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *P. moreirai* e *P. hilarii*) sejam estritamente relacionadas. Sendo assim, outros estudos envolvendo a (s) família (s) de DNA repetitivo que estão relacionadas com a diversificação do cromossomo W serão extremamente importantes no entendimento da evolução deste marcador cromossômico entre os Parodontidae.

O mapeamento físico da seqüência pPh2004 sobre os cromossomos de *P. hilarii* por Vicente et al (2003) evidenciou 16 sítios terminais em autossomos, além de estar localizado nas regiões terminais do braço longo do cromossomo Z e do braço curto no cromossomo W (Figura 4j). Em *P. moreirai* este DNA satélite foi encontrado por Centofante et al (2002) em quatro pequenos sítios terminais de autossomos, além de estar situado nas regiões terminais do braço longo do cromossomo Z e do braço curto no cromossomo W (Figura 4i). No presente trabalho, as espécies *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *A. piracicabae* e *A. vittatus* submetidas à FISH não evidenciaram o DNA satélite pPH2004 nos cromossomos. No entanto, foram localizados seis sítios em *A. affinis* (par 2 e par 13), 10 sítios pPh2004 sobre os autossomos de *P. nasus* e 2 sítios pPh2004 em *P. pongoensis* (par 13) (Figuras 3 e 4).

De acordo com vários autores, as seqüências de DNA satélite têm um importante papel na evolução dos genomas por estar envolvido com rearranjos cromossômicos e a rápida evolução desta fração repetitiva promovendo movimentos intragenômicos entre cromossomos não homólogos e entre diferentes domínios cromossômicos (Wichman et al 1991, Slamovits et al 2001, Vicari et al 2008, Kantek et

al 2009, Vicari et al in press). Do mesmo modo, o DNA satélite pPh2004 parece estar atuando na diversificação do genoma das espécies de parodontídeos que detêm tais sequências. As espécies *P. moreirai* e *P. hilarii* apresentam este DNA satélite em regiões terminais dos cromossomos Z e W, além de sítios em pares autossômicos. No entanto, a amplificação da região heterocromática do cromossomo W não está relacionada ao DNA satélite pPh2004. O mesmo ocorre em relação às espécies *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. e *A. vladii*, que não possuem o DNA satélite pPh2004, mas apresentam o heteromorfismo de cromossomos sexuais ZW.

A análise molecular das sequências repetitivas e seu mapeamento físico nos cromossomos de diferentes espécies têm se mostrado relevante como marcador evolutivo (Saffery et al 1999, Lander et al 2001, Ugarkovic & Plohl 2002). O DNA satélite pPh2004 tem sido localizado, até o presente momento, em todas as espécies estudadas de *Parodon*: *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis*, além da espécie *A. affinis* (Centofante et al 2002, Vicente et al 2003, presente estudo). As demais espécies de *Apareiodon* estudadas não apresentam este DNA satélite. Diante destes dados, as espécies que compartilham o DNA satélite pPh2004 devem ter divergido mais recentemente que as outras espécies que não a possuem. Assim, estas sequências repetitivas poderiam ser utilizadas como marcadores filogenéticos (De La Herrán et al 2001). Um exemplo semelhante foi encontrado em espécies da família Sparidae, que possui, assim como Parodontidae, alguns conflitos quanto a sua taxonomia. Segundo as características morfológicas consideradas (padrão de dentição), os Sparidae são tradicionalmente divididos em três subfamílias: Denticinae, Sparinae e Boopsinae. Entretanto, segundo análises filogenéticas baseadas em duas famílias de DNAs satélites, esta família é composta por duas

grandes linhagens distintas (De La Herrán et al 2001). Nesse sentido, é possível inferir que as espécies que possuem o DNA satélite pPh2004 (*A. affinis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis*) têm divergido mais recentemente e são mais estritamente relacionadas entre os Parodontidae.

Em conclusão, os marcadores cromossômicos podem ser utilizados em estudos para o agrupamento das espécies de Parodontidae. As localizações dos sítios de DNAr 18S no par subtelocêntrico de todas as espécies de *Apareiodon* pode ser considerada sinapomórfica para a família quando comparada com o grupo irmão, além disso a localização do rDNA 5S em região proximal do braço curto de um par submetacêntrico pode ser um caráter conservado em parodontídeos. A origem e a diversificação dos cromossomos sexuais na família necessitam ainda de estudos para a identificação do DNA repetitivo que diferenciou o cromossomo W. No entanto, com o marcador cromossômico de DNA satélite pPh2004 é possível inferir que as espécies *A. affinis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis* formam um clado diferenciado em Parodontidae em relação as demais espécies de *Apareiodon* estudadas.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 08/54620-1), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938).

Referências Bibliográficas - Final da Tese.

Tabela I – Pontos de amostragem e distribuição nas bacias das espécies estudadas de Parodontidae.

Espécie	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Exemplares
<i>A. affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	7 ♂; 10 ♀
<i>A. ibitiensis</i>	Ribeirão Araras (MG)	São Francisco	8 ♂; 9 ♀
	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	5 ♂; 7 ♀
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Tibagi (PR)	Alto Paraná	23 ♂; 18 ♀
<i>A. vladii</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	12 ♂; 14 ♀
<i>A. piracicabae</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	17 ♂; 11 ♀
<i>A. vittatus</i>	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	3 ♂; 5 ♀
<i>P. nasus</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	13 ♂; 16 ♀
<i>P. pongoensis</i>	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	4 ♂; 3 ♀

Museu Nacional do Rio de Janeiro/UFRJ. Rio de Janeiro, Brazil.

Vouchers numbers: 31428; 32711; 32741; 32766; 33543; 33544; 33545; 33713; 35633; 35634; 35635; 35636; 35640.

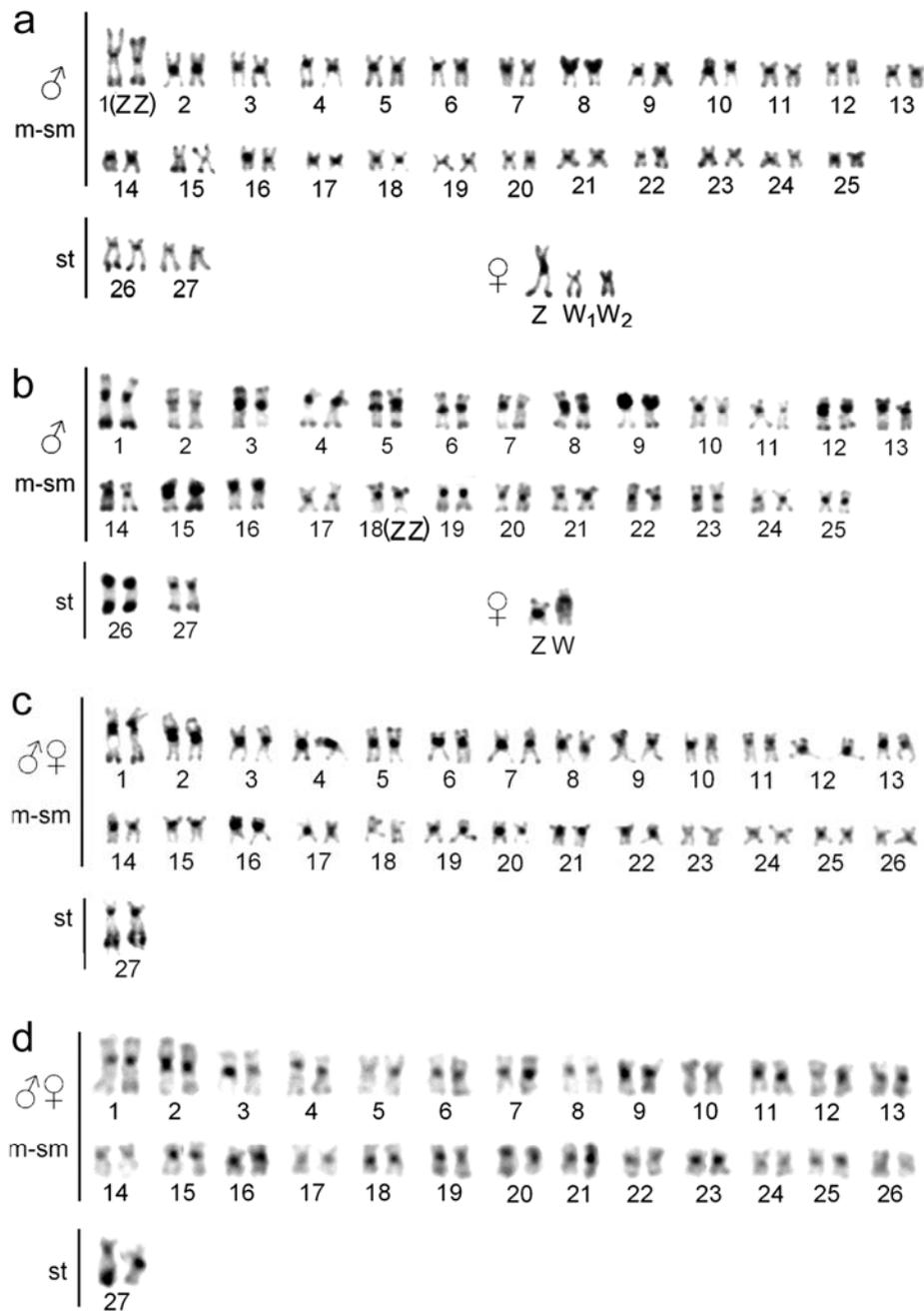


Figura 1 - Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos ao bandamento-C: em (a) macho de *A. affinis*, em destaque os cromossomos sexuais ZW₁W₂ das fêmeas; em (b) macho de *A. ibitiensis*; em destaque par sexual ZW das fêmeas; em (c) cariótipo homomórfico representativo de *A. piracicabae* e; (d) cariótipo homomórfico representativo de *A. vittatus*. Barra= 5 μm.

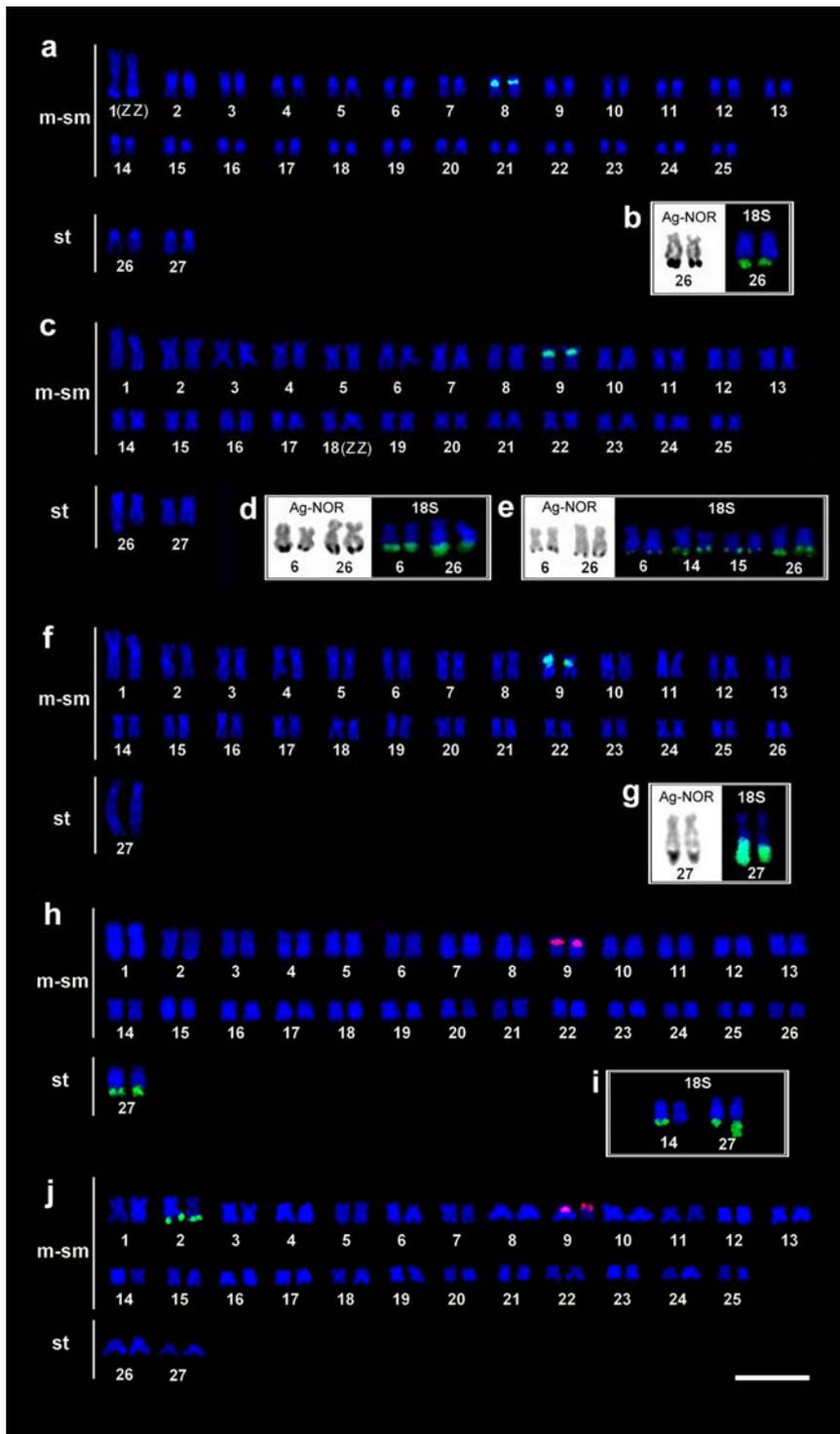


Figura 2- Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos a FISH para localização dos sítios de rDNA: em (a) cariótipo de exemplar macho de *A. affinis* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (b) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S; em (c) cariótipo de exemplar macho de *A. ibitiensis* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (d) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S para a população de *A. ibitiensis* do rio São Francisco; em (e) destaque para os pares portadores das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S para a população de *A. ibitiensis* do alto rio Paraná; (f) cariótipo de exemplar macho de *A. piracicabae* submetido a FISH com sonda de rDNA 5S; (g) destaque para o par

portador das RONS pelo nitrato de prata e FISH com sonda de rDNA 18S; em (h) cariótipo de exemplar fêmea de *A. vittatus* submetido a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho); (i) variação do número de sítios de rDNA 18S em *A. vittatus* e; em (j) cariótipo de exemplar fêmea de *P. pongoensis* submetido a dupla FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Barra= 5 μ m.

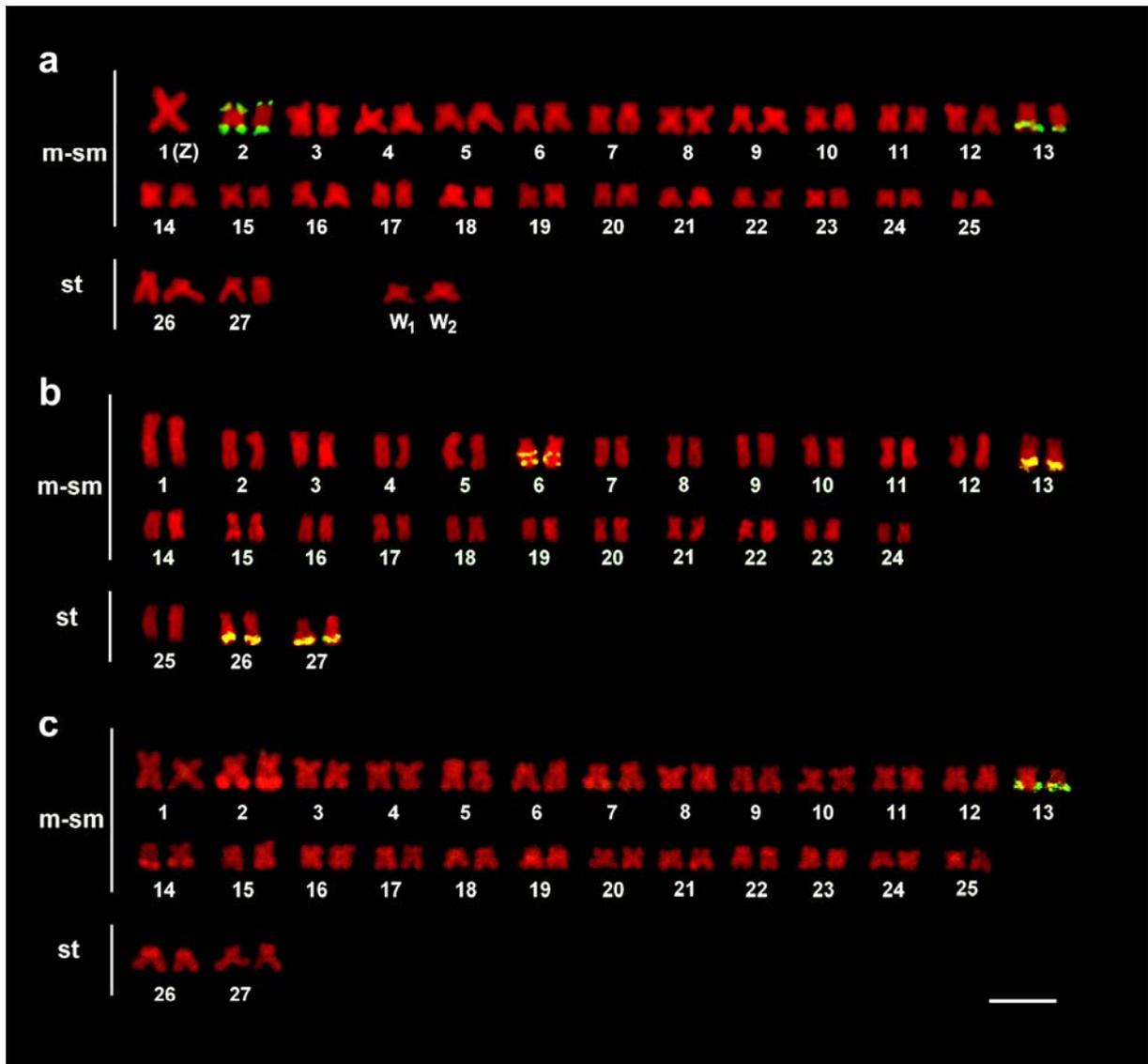


Figura 3 - Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos a FISH com sonda do DNA satélite pPh2004: em (a) cariótipo de exemplar fêmea de *A. affinis* evidenciando sítios pPh2004 nos pares 2 e 14; em (b) cariótipo de exemplar macho de *P. nasus* mostrando sítios pPh2004 nos pares 6, 13, 26 e 27 e; em (c) exemplar fêmea de *P. pongoensis* evidenciando o par 13 com sítios de DNA satélite pPh2004. Barra= 5 µm.

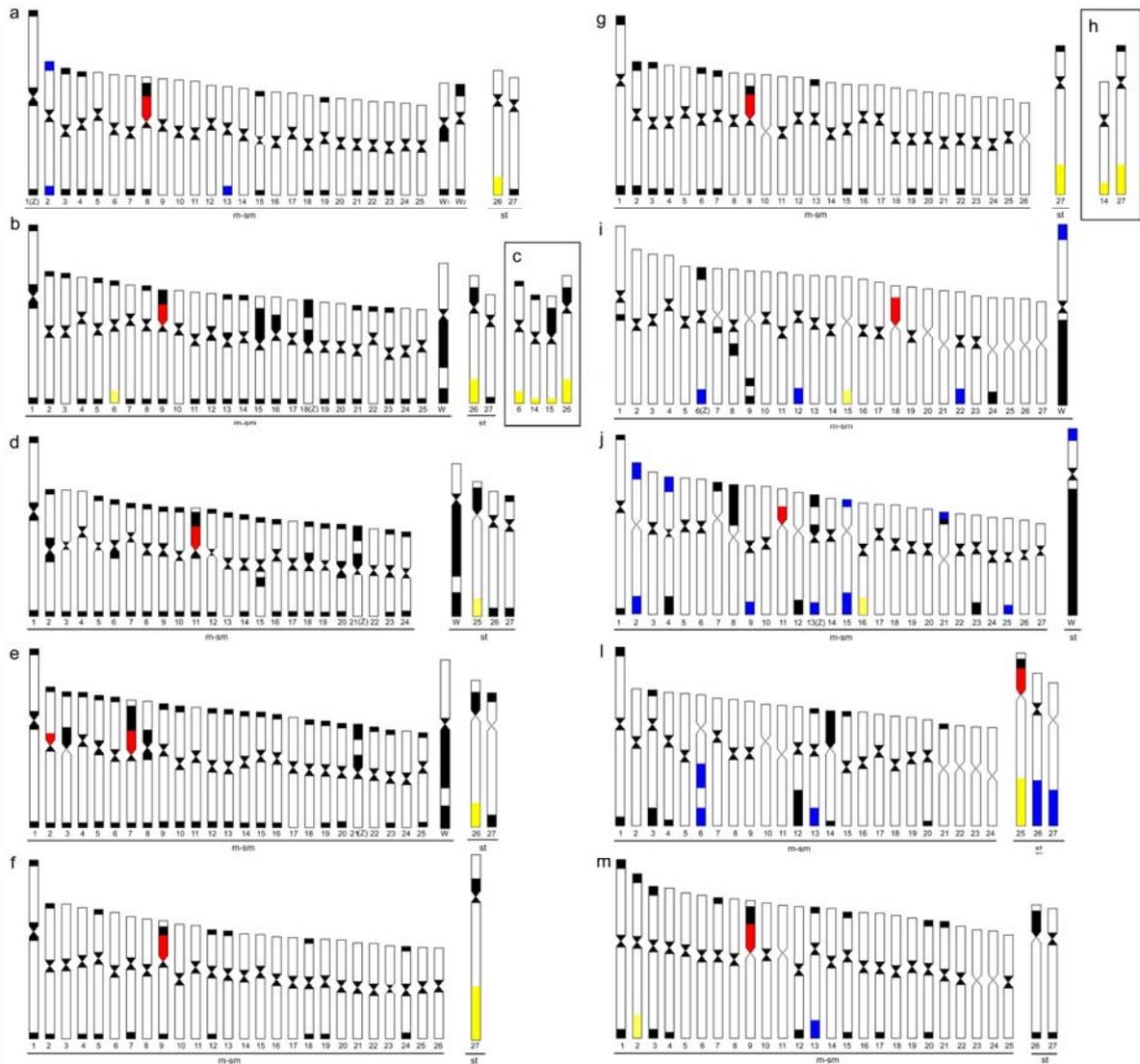


Figura 4 - Idiogramas representativos dos marcadores cromossômicos de número/fórmula cromossômica, presença/ausência de cromossomos sexuais, heterocromatina constitutiva (preto), sítios de rDNA 5S (vermelho); sítios de rDNA 18S (verde) e, sítios do DNA satélite pPh2004 nas espécies da família Parodontidae. Em (a) fêmea de *A. affinis* evidenciando a situação heteromórfica para os cromossomos sexuais ZW_1W_2 ; (b) fêmea de *A. ibitiensis* (Ribeirão Araras -MG) mostrando o par sexual ZW; (c) variação dos cromossomos com sítios adicionais de rDNA 18S em *A. ibitiensis* (rio Passa Cinco - SP); (d) fêmea de *Apareiodon* sp. evidenciando o par ZW; (e) fêmea de *A. vladii* evidenciando o par ZW; (f) situação homomórfica de *A. piracicabae*; (g) situação homomórfica de *A. vittatus*; (h) variação interindividual de sítios de rDNA 18S em *A. vittatus*; (i) fêmea de *P. moreirai* evidenciando o par sexual ZW; (j) fêmea de *P. hilarii* evidenciando o par sexual ZW; (l) situação homomórfica de *P. nasus*; (m) situação homomórfica de *P. pongoensis*.

Capítulo 3 – Identificação de espécies de peixes invasoras em decorrência de conexões entre bacias hidrográficas. Contribuição citogenética.

Resumo

Foram realizadas análises cromossômicas em algumas espécies de peixes, em uma região impactada pela conexão entre duas bacias hidrográficas distintas, onde um rio, originalmente pertencente à bacia do rio Paraná, foi transposto para a bacia do rio São Francisco, no Estado de Minas Gerais, Brasil. O objetivo proposto foi o de avaliar a dispersão e a ocorrência de espécies invasoras de uma bacia hidrográfica para outra, e a conseqüente nova distribuição geográfica de espécies previamente isoladas entre si. Foram estudadas espécies das famílias Parodontidae (*Apareiodon piracicabae*, *A. ibitiensis*, *Parodon hilarii* e *P. nasus*), Sternopygidae (*Eigenmannia virescens*) e Gymnotidae (*Gymnotus sylvius*). As quatro espécies de Parodontidae apresentaram $2n=54$ cromossomos, mas com estrutura cariotípica espécie-específica, incluindo a presença de sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em *A. ibitiensis* e *P. hilarii*. Dois cariomorfos distintos (A e B) foram identificados para *E. virescens*, embora apresentando o mesmo número diplóide $2n=38$ cromossomos. *G. sylvius* apresentou $2n=40$ cromossomos. *P. hilarii* e *E. virescens* (cariomorfo B) são consideradas espécies nativas para a bacia do rio São Francisco, enquanto que *A. piracicabae*, *A. ibitiensis*, *E. virescens* (cariomorfo A) e *G. sylvius* são espécies conhecidas para a bacia do rio Paraná, e *P. nasus* para a bacia do Paraná-Paraguai. Assim sendo, a presença dessas últimas espécies na bacia do São Francisco indica que as mesmas se dispersaram da bacia do rio Paraná para a bacia do rio São Francisco, em decorrência da transposição de rio previamente ocorrida, podendo ser portanto consideradas

como espécies invasoras nesta bacia. Outros eventos que provavelmente podem estar implicados nesta dispersão são também discutidos.

Introdução

O Brasil destaca-se pela riqueza e diversidade de sua fauna de peixes, registrando mais de 2.500 espécies válidas de água doce (Buckup et al. 2007). De maneira geral, pode-se afirmar que cada bacia fluvial brasileira possui uma fauna própria de peixes, associada a um número maior ou menor de formas semelhantes entre elas (Menezes 1970). Esta particularidade originou-se de uma série de fatores históricos, em paralelo à aptidão das espécies para colonizar e persistir em um determinado local. Por sua vez, as barreiras geográficas naturais, impedindo a troca de espécies entre regiões, produzem distintas biotas aquáticas entre as diferentes bacias hidrográficas (Rahel 2002). Eventos de captura de cabeceiras e águas emendadas têm sido também sugeridos para explicar a distribuição da ictiofauna em alguns casos particulares (Menezes 1970; Moreira-Filho & Buckup 2005). Por sua vez, atividades antrópicas, como a pesca, o escape de fazendas pesqueiras e a transferência de corpos d'água pela construção de barragens, têm proporcionado alternativas para que os peixes possam ultrapassar barreiras naturais, facilitando assim sua dispersão na natureza (Elvira & Almodóvar 2001; Rahel 2002).

Na década de 1960, o rio Piumhi, originalmente pertencente à bacia do Alto rio Paraná, foi transposto para a bacia do rio São Francisco, devido à construção do reservatório de Furnas. Antes da transposição existia um pantanal associado ao rio Piumhi, chamado Pantanal do Cururu. Alguns dos tributários do rio Piumhi (ou seja, córregos da Onça, Mutuca e do Cervo) não desaguavam no curso principal do rio,

mas fluíam dentro da grande área deste pantanal (Moreira-Filho & Buckup 2005). Um sistema de drenagem foi efetuado na região deste pântano, por onde corria o leito do rio Piumhi e suas lagoas marginais, o que alterou o seu curso, canalizando e efetivando a transposição de suas águas e as do pântano para a margem direita do rio São Francisco (Moreira-Filho & Buckup 2005). Tal evento provavelmente possibilitou a mistura da fauna de peixes do rio Piumhi, bem como a de banhados, lagos e tributários associados com a ictiofauna da bacia do São Francisco. Previsivelmente, este fato deve ter ocasionado um grande impacto na atual composição ictiofaunística dessa última bacia (Moreira-Filho & Buckup 2005), possibilitando a coexistência de algumas espécies de peixes que se encontravam em alopatria, bem como possíveis ocorrências de competição, predação, parasitismo e a hibridação interespecífica.

Nas últimas décadas, os estudos citogenéticos vêm contribuindo extensamente com a ictiologia Neotropical, fornecendo informações úteis para os estudos taxonômicos, evolutivos, filogenéticos e na caracterização de complexos de espécies (Bertollo et al. 1986). O presente trabalho teve como objetivo caracterizar cromossomicamente algumas espécies de peixes presentes na região de transposição do rio Piumhi (bacia do rio São Francisco), buscando evidências sobre possível invasão e dispersão de espécies em consequência dessa transposição, e sua possível influência na composição ictiofaunística dessa bacia.

Material e Métodos

Foram analisadas as seguintes espécies de peixes: *Apareiodon piracicabae* Eigenmann 1907, *A. ibitiensis* Campos, 1944, *Parodon nasus* Kner, 1859, *P. hilarii*

Reinhardt 1866 (Characiformes, Parodontidae); *Eigenmannia virescens* Valenciennes 1842 (Gymnotiformes, Sternopygidae) e *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matioli, 1999 (Gymnotiformes, Gymnotidae) provenientes das bacias do rio São Francisco -Estado de Minas Gerais, Brasil, na região da transposição do rio Piumhi e do Alto rio Paraná - Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1). As localidades das coletas, bem como o número de espécies analisadas, constam da Tabela 1.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, de acordo com a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978). Fishes were anesthetized with clove oil according to Henyey et al. (2002). As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram detectadas pela impregnação com nitrato de Prata (AgNORs), de acordo com Howell & Black (1980). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a), conforme a relação de braços (Levan et al. 1964). Os cromossomos m e sm foram reunidos em um único grupo, considerando que vários cromossomos, principalmente entre os Characiformes, apresentaram uma razão de braços que poderia classificá-los tanto como m como sm. Pelo mesmo motivo, os cromossomos st e a foram também agrupados nos Gymnotiformes. Assim sendo, além de padronizar o cariótipo para as espécies dessas duas ordens, procurou-se eliminar uma possível ambigüidade na classificação dos cromossomos. Na organização do cariótipo os cromossomos foram dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

Os dados cromossômicos obtidos permitiram identificar os seguintes caracteres diagnósticos para cada uma das espécies analisadas:

A - Família Parodontidae

Parodon nasus - Número diplóide $2n=54$ cromossomos, em ambos os sexos, com cariótipo composto por 24 pares m-sm e 3 pares st, sem cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 2). As AgNORs foram localizadas na região terminal do braço longo do par cromossômico st nº 25 (Fig. 2 - box), em correspondência com uma constrição secundária aí localizada.

Parodon hilarii - Número diplóide $2n=54$ cromossomos, em ambos os sexos. O cariótipo dos machos apresentou 27 pares m-sm. O cariótipo das fêmeas evidenciou 26 pares m-sm, além de um cromossomo sm de tamanho médio e um st de tamanho grande, sem homólogos. Estes dados caracterizam um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde o cromossomo st grande, característico das fêmeas, corresponde ao cromossomo W, enquanto que o cromossomo sm médio, também presente no cariótipo dos machos (par 13), corresponde ao cromossomo Z (Fig. 2). As AgNORs foram localizadas na região terminal do braço longo do par m nº 15 (Fig. 2 - box), em correspondência com uma constrição secundária aí localizada.

Apareiodon ibitiensis - Número diplóide $2n=54$ cromossomos em ambos os sexos. O cariótipo dos machos apresentou 25 pares m-sm e 2 pares st, enquanto nas fêmeas ocorrem 24 pares m-sm, 2 pares st, além de um cromossomo sm de tamanho grande e um m de tamanho médio, sem homólogos. Assim sendo, esta espécie também apresenta um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde o cromossomo sm grande, característico das fêmeas, corresponde ao cromossomo W e o m médio,

também presente no cariótipo dos machos (par 18), corresponde ao cromossomo Z (Fig. 2). As AgNORs foram localizadas na região terminal do braço longo do par st nº 26 (Fig. 2 - box), em correspondência com uma constrição secundária aí localizada.

Apareiodon piracicabae - Número diplóide $2n=54$ cromossomos em ambos os sexos, com cariótipo constituído por 26 pares m-sm e 1 par st, sem cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 2). As AgNORs foram localizadas na região terminal do braço longo do par st nº 27 (Fig. 2 - box), em correspondência com uma constrição secundária aí localizada.

B - Família Sternopygidae

Eigenmannia virescens apresentou dois cariomorfos (formas de cariótipos distintos) bem diferenciáveis, embora apresentando o mesmo número diplóide de cromossomos:

Cariomorfo A (Ribeirão das Minhocas): número diplóide $2n=38$ cromossomos em ambos os sexos, com cariótipo composto por 8 pares m-sm e 11 pares st-a, sem cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 3). As AgNORs foram localizadas em todo braço curto do par a nº 15 (Fig. 3- box).

Cariomorfo B (Ribeirão dos Patos): número diplóide $2n=38$ cromossomos para ambos os sexos. O cariótipo dos machos é composto por 11 pares m-sm e 8 pares st-a, enquanto que o cariótipo das fêmeas apresentou 11 pares m-sm e 7 pares st-a, além da ocorrência adicional de um cromossomo m e um cromossomo a, ambos de tamanho médio, sem homologia, constituindo um provável sistema de cromossomos

sexuais ZZ/ZW (Fig. 3). Entretanto, não foi possível identificar com precisão os cromossomos Z e W entre os demais do cariótipo. As AgNORs localizaram-se em todo braço curto do par a nº 17 (Fig. 3 - box).

C - Família Gymnotidae

Gymnotus sylvius - número diplóide $2n=40$ cromossomos para machos e fêmeas, com cariótipo composto por 8 pares m-sm e 2 pares st-a, sem cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 3). As AgNORs foram localizadas no braço curto do par st nº 20 (Fig. 3 - box), em concordância com a constrição secundária aí localizada.

Discussão

A integridade dos ecossistemas aquáticos vem sendo desafiada mundialmente pelas espécies de peixes invasoras. Desta forma há uma necessidade crescente de compreender os processo de invasão e as diferenças ecológicas entre as espécies nativas e invasoras, e assim predizer os efeitos decorrentes desse processo (Moyle & Light 1996; Alcaraz et al. 2005). Em alguns casos, as espécies invasoras podem alterar o ambiente de tal forma que espécies nativas têm seu número drasticamente reduzido (Agostinho et al. 2003) ou até mesmo se extinguir (Goldshmidt et al. 1993). Entretanto, existem exemplos de invasores que se estabelecem de tal forma que não provocam a extinção de organismos nativos, integrando-se na biota local (Moyle & Light 1996).

Espécies de peixes invasoras vêm sendo detectadas em alguns rios do Brasil, principalmente em decorrência de alterações ambientais antrópicas (Agostinho & Julio Jr 2002; Pazza & Júlio Jr. 2003; Margarido et al. 2007). Das quatro espécies de

Parodontidae ora analisadas, apenas *P. hilarii* é endêmica para a bacia do rio São Francisco. Assim sendo, *A. piracicabae*, *A. ibitiensis* e *P. nasus*, originalmente descritas para a bacia do rio Paraná, podem ser consideradas invasoras na bacia do São Francisco. Em um dos afluentes do rio São Francisco (ribeirão das Araras), na área da transposição do rio Piumhi, foi detectada simpatria e sintopia entre *A. ibitiensis*, *P. nasus* e *P. hilarii*. Particularmente *P. nasus* e *P. hilarii*, embora morfologicamente muito semelhantes, são cromossomicamente bem distintas, característica esta importante para o isolamento reprodutivo e coexistência simpátrica entre essas espécies. Por outro lado, também é importante considerar que o comportamento reprodutivo dos Parodontidae pode ser também diferenciado. Assim, por exemplo, *A. affinis*, *A. ibitiensis* e *P. nasus* mostram diferenças no período de reprodução, estendendo-se de julho a outubro para *A. ibitiensis*, de setembro a novembro para *A. affinis* e de setembro a dezembro para *P. nasus*, além de diferenças quanto à fecundidade média (Barbieri et al. 1983; Barbieri et al 1985), enquanto que em *A. piracicabae* o período de desova ocorre nos meses de abril e maio (Sazima 1980). Portanto, um conjunto de parâmetros distintos, como cromossômicos, dinâmica reprodutiva, e provavelmente também ecológicos, pode explicar a coexistência simpátrica e sintópica das espécies de Parodontidae, possivelmente isoladas por mecanismos pré- e pós-copulatórios.

Os resultados obtidos para o cariomorfo A de *E. virescens*, com ausência de cromossomos sexuais, são semelhantes aos encontrados em uma população do rio Mogi-Guaçu, na bacia do Alto Paraná (Almeida-Toledo et al. 2001). Já os dados apresentados pelo cariomorfo B, com presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW, são semelhantes aos da população característica do rio São Francisco (Almeida-Toledo et al. 2002). Paralelamente, foi também demonstrada a ocorrência de *G. sylvius* na

bacia do rio São Francisco. Esta espécie, assim como o cariomorfo A de *E. virescens*, é característica da bacia do Alto rio Paraná (Albert et al 1999), e não havia sido até então registrada a sua ocorrência na bacia do São Francisco, onde apenas a espécie congênica *G. bahianus* (Albert & Crampton, 2003) era conhecida (citado como *G. carapo* por Britski et al 1988). Assim sendo, *G. sylvius*, bem como o cariomorfo A de *E. virescens*, devem também representar formas invasoras na bacia do São Francisco.

Eigenmannia virescens, *G. sylvius*, assim como as algumas espécies de Parodontidae, apresentam dificuldades taxonômicas devido à ausência de características morfológicas e merísticas conspícuas que possibilitem uma boa diferenciação entre espécies/populações desses grupos. Entretanto, características cromossômicas, assim como marcadores moleculares, podem ser facilmente empregadas para caracterizar esses grupos com precisão, como é o caso dos resultados ora apresentados demonstrando a utilidade desses marcadores como ferramentas adicionais para uma boa identificação de espécies/populações de Parodontidae, Gymnotidae e Sternopygidae, e a conseqüente caracterização de grupos que ora fazem parte da ictiofauna da bacia do São Francisco, mas que representam grupos invasores provenientes da bacia do Alto rio Paraná. Paralelamente aos nossos resultados, outras espécies dos gêneros *Hoplias* (Blanco et al. 2009) e *Astyanax* (Peres et al. 2009) já foram também caracterizadas como invasoras na bacia do rio São Francisco, corroborando assim os dados ora apresentados.

Mediante aos resultados obtidos no presente trabalho, duas condições distintas podem explicar a migração de espécies da bacia do alto rio Paraná para a bacia do rio São Francisco. A primeira delas, de origem antrópica, inevitavelmente

favoreceu este processo pela transposição do rio Piumhi (Moreira-Filho & Backup 2005). A segunda delas, devida a eventos naturais, pode igualmente ter tido também influência nessa troca de ictiofauna. Tal proposição encontra respaldo na análise de antigas cartas cartográficas, onde pode se verificar que as nascentes de alguns tributários da margem esquerda do rio Piumhi e do antigo pantanal da região apresentavam uma distância de apenas 400m a 1 km dos afluentes da margem direita do São Francisco, além de altitudes similares, com cerca de 800m. Assim sendo, é perfeitamente plausível que, em épocas de cheias, tenham ocorrido conexões entre as bacias do Alto Paraná e São Francisco através do pantanal, possibilitando uma provável rota migratória para os peixes, conforme também destacado por Blanco et al. (2009) para espécies do gênero *Hoplias*. Registros da ocorrência de *A. piracicabae* no rio São Francisco, anterior à transposição, corroboram perfeitamente esta hipótese. Doze exemplares de *A. piracicabae*, que fazem parte do acervo do Museu da Universidade Federal do Rio de Janeiro (lote MNRJ 6149), foram coletados nesta bacia em 1942, portanto em um período anterior ao da transposição do rio Piumhi. Contudo, *P. nasus* e *G. silvius* ainda não tinham sido constatadas para a bacia do S. Francisco (Backup et al. 2007), Sendo assim, os dados agora apresentados correspondem às primeiras citações dessas espécies para esta bacia.

Assim, podemos concluir que tanto a transposição do rio Piumhi, bem como a via migratória natural pelo antigo pantanal, são perfeitamente plausíveis como rotas de transferência de *P. nasus*, *A. piracicabae*, *A. ibitiensis*, *E. virescens* (cariomorfo A) e *G. silvius* da bacia do Alto rio Paraná para a bacia do rio São Francisco. De fato, as características cromossômicas espécies-específicas foram conclusivas quanto à

identificação dessas espécies/populações, fornecendo claras evidências sobre a invasão desses grupos na bacia do São Francisco.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, processo: IBAMA/MMA), pela licença de captura de peixes. Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 08/54620-1), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938).

Referências Bibliográficas - Final da Tese.

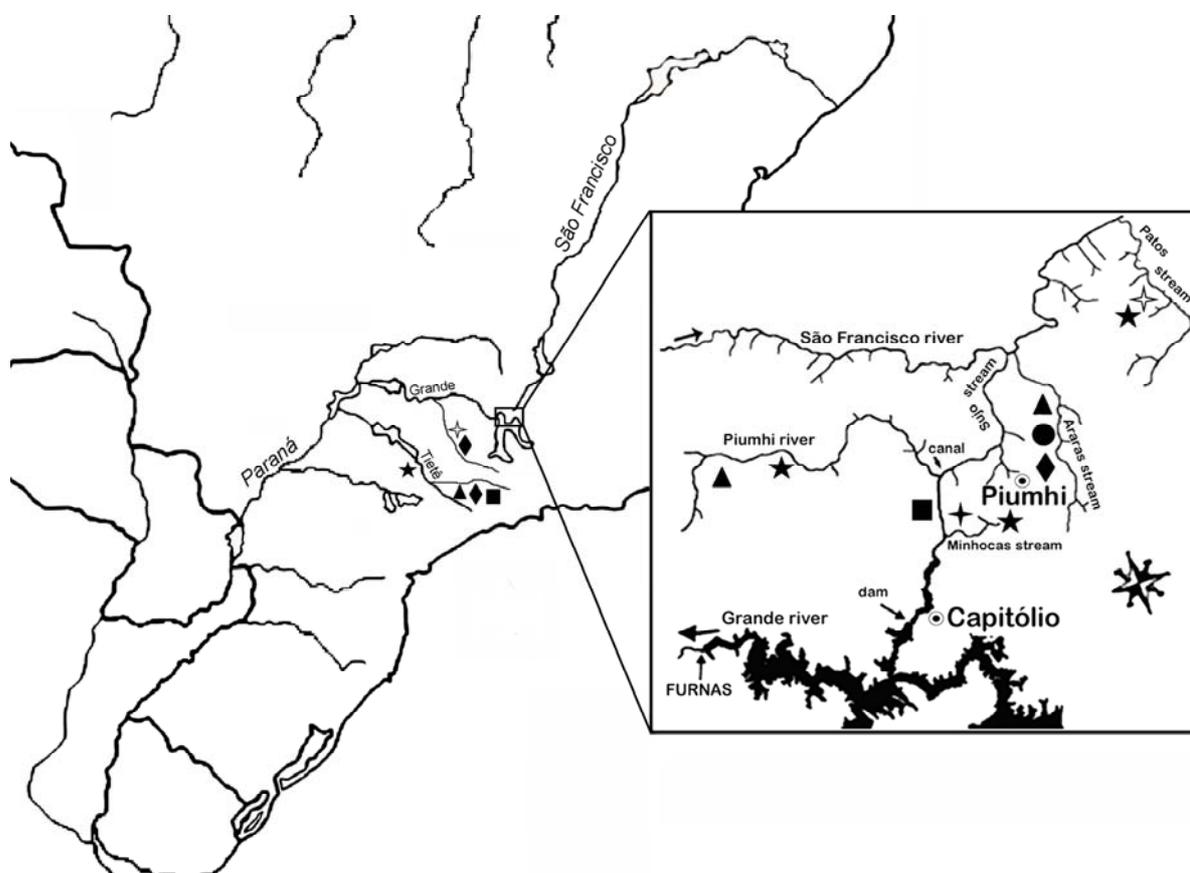


Figura 1 - Mapa do Brasil ressaltando as grandes bacias hidrográficas do sistema Paraná e São Francisco, e no detalhe a área de transposição do rio Piumhi. Os símbolos representam as espécies coletadas: triângulo para *Parodon nasus*; círculo para *Parodon hilarii*; losango para *A. ibitiensis*; quadrado para *A. piracicabae*; estrela de quatro pontas cheia para *Eigenmannia virescens* cariomorfo A; estrela de quatro pontas vazia para *Eigenmannia virescens* cariomorfo B e estrela de cinco pontas para *G. sylvius*.

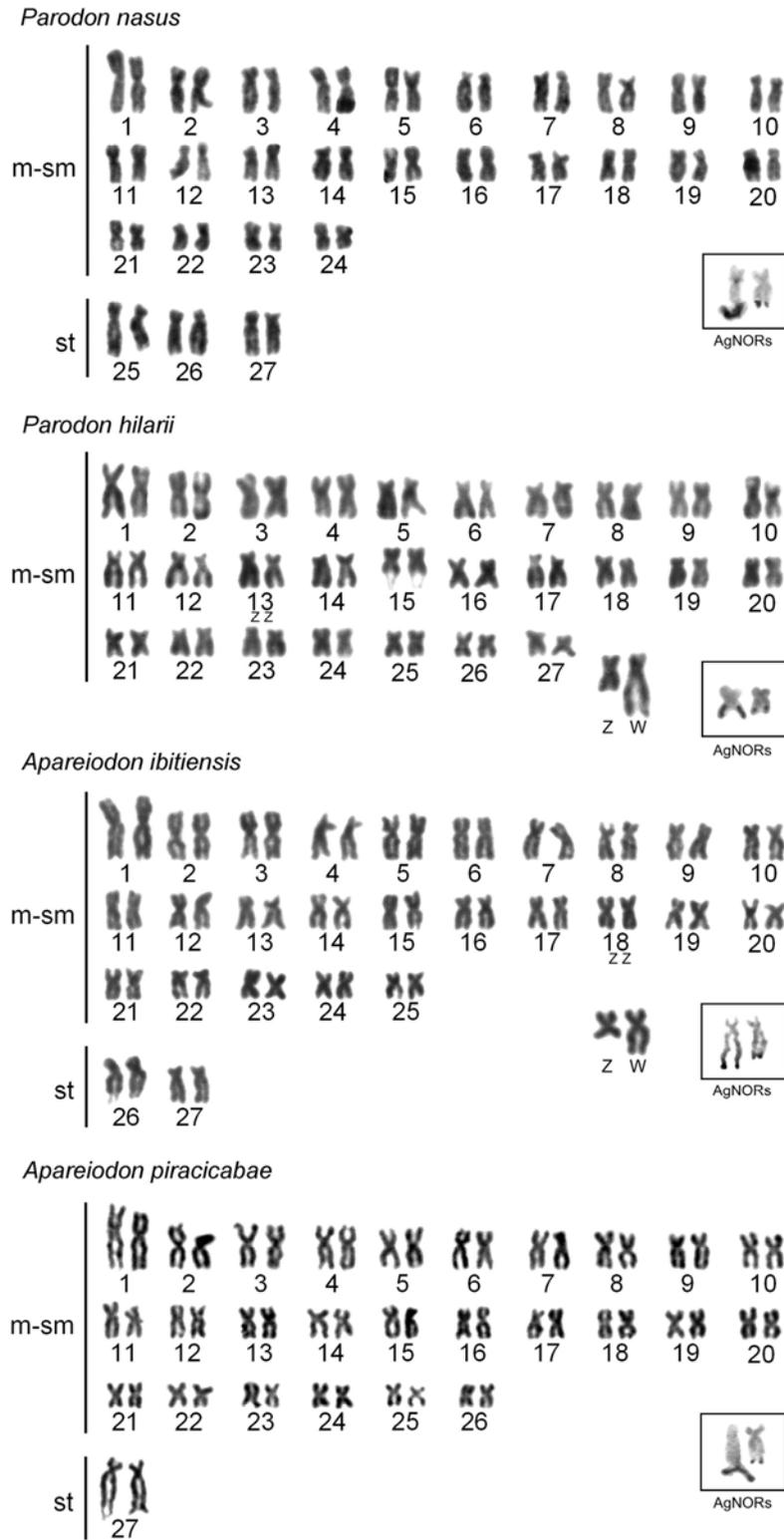


Figura 2- Cariótipos de *P. nasus*, *P. hilarii*, *Apareiodon ibitiensis* e *A. piracicabae* corados com Giemsa. Nos respectivos box estão representados as AgRONs.

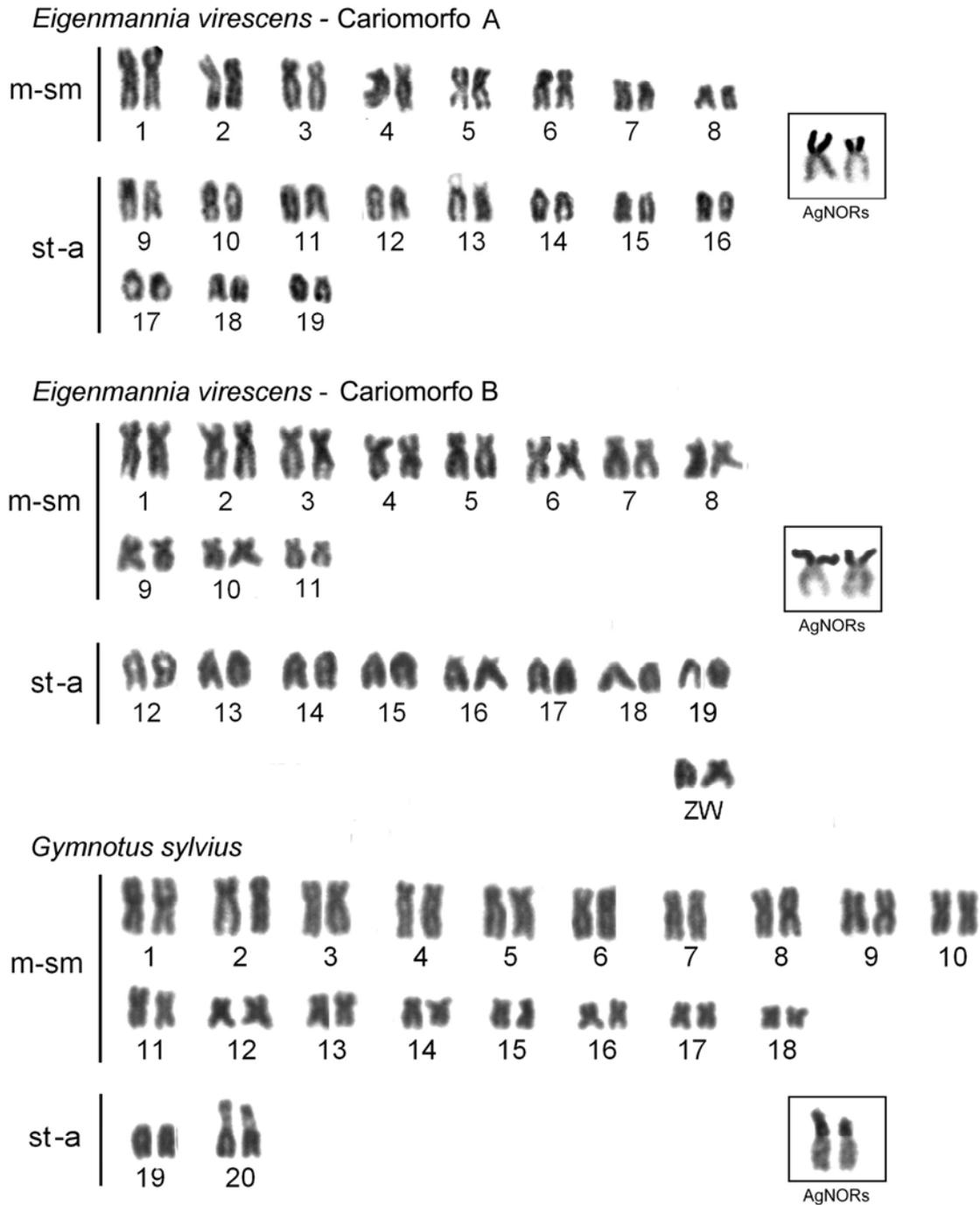


Figura 3 - Cariótipos de *Eigenmannia virescens* cariomorfo A, *E. virescens* cariomorfo B evidenciando os cromossomos sexuais Z e W, e *Gymnotus sylvius*. Nos respectivos box estão representados as AgNORs.

Conclusões e Considerações Finais

*I - Sistema de cromossomos sexuais em *Apareiodon ibitiensis**

Estudos citogenéticos realizados em *A. ibitiensis* do alto Paraná (Moreira-Filho et al 1985) e em *Apareiodon* sp. A do São Francisco (Jesus 1996, Jesus e Moreira-Filho 2000a) não demonstraram a presença de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW, apesar da suspeita de algumas diferenças no padrão de bandamento C nesta espécie (Jesus 1996). No presente trabalho, a adaptação e a utilização da técnica de bandamento C corada com fluorocromo Iodeto de Propídio foram extremamente relevantes na identificação das bandas heterocromáticas no complemento cromossômico, principalmente a heterocromatina mais pálida presente no braço longo do cromossomo W, quase imperceptível quando corada com a Giemsa. Desta forma, esta técnica foi mais resolutiva na identificação dos cromossomos sexuais e possibilitou a descrição do sistema sexual do tipo ZZ/ZW em *A. ibitiensis*.

Em relação à presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW em Parodontidae, segundo Vicari et al (2006), este sistema pode não ser um estado apomórfico para *Parodon* e *Apareiodon*, e provavelmente possui uma origem comum dentro da família.

II - Caracterização do padrão de distribuição dos DNAs ribossômicos 18S em Parodontidae

As regiões organizadoras de nucléolo, determinadas pelas técnicas de AgRONS e FISH com sonda de DNAr 18S pode ser considerado, de maneira geral, um caráter conservado na maioria das espécies de Parodontidae, entretanto algumas variações podem ser observadas em *A. affinis*, *A. piracicabae* e *A. ibitiensis*.

Populações de *A. affinis* das bacias do baixo rio Paraná (Argentina) e rio Paraguai (Jesus & Moreira-Filho 1999, Jorge e Moreia-Filho 2000, Jorge e Moreira-Filho 2004) são caracterizadas por possuírem regiões organizadoras de nucléolos em cromossomos acrocêntricos, pois apresentam polimorfismo estrutural originado por inversões pericêntricas. Em *A. piracicabae*, polimorfismo caracterizado por RONS intercalares em um par cromossômico subteloentrico pôde ser verificado, resultado de uma inversão paracêntrica. Já em *A. ibitiensis*, polimorfismo envolvendo eventos de dispersão pode ter originado sítios adicionais. No presente trabalho, nenhuma das populações analisadas de *A. piracicabae* revelaram polimorfismo de RONS e na população de *A. affinis* não foi verificada a presença de cromossomos acrocêntricos.

Como outros grupos externos de peixes, como Anostomidae e Curimatidae, assim como as demais espécies de Parodontidae apresentam RONS em cromossomos com dois braços, na região terminal e em apenas um par de cromossomos. A presença das RONS em cromossomos acrocêntricos como em *A. affinis*, de forma intercalar como em *A. piracicabae* e a presença de até oito cromossomos como em *A. ibitiensis*, indicam uma condição derivada par este do grupo de peixes. Desta forma, o padrão de distribuição das RONS não pode ser considerado tão conservado em Parodontidae.

III - Caracterização do padrão de distribuição dos DNAs ribossômicos 5S em Parodontidae

A hibridação com sonda de DNA ribossômico 5S se comporta de maneira distinta ao DNA ribossômico 18S. Apesar de estar localizado, assim como a maioria das espécies de peixes, na posição intersticial dos cromossomos e em um ou dois pares (Martins e Wasko 2004), em todas as espécies analisadas até o momento de Parodontidae, este gene está localizado em pares cromossômicos distintos. Desta forma, o gene ribossômico 5S é considerado um relevante marcador citotaxonomico para a família.

IV - DNA satélite no auxílio das relações filogenéticas em Parodontidae

Em relação ao padrão de distribuição do DNA satélite pPh2004 (Vicente et al 2003), todas as espécies de *Parodon* analisadas até o momento: *P. nasus*, *P. hilarii*, *P. pongoensis* e *P. moreirai* possuem fortes marcações em diversos cromossomos. Já nas espécies de *Apareiodon* analisadas no presente trabalho: *A. ibitiensis*, *A. piracicabae*, *A. vladii* e *Apareiodon* sp. nenhum sítio contendo esta família de DNA satélite foi detectado. Entretanto, foi observado em *A. affinis* (bacia do alto rio Paraná) resquícios deste DNA satélite. Este fato poderia sugerir que as espécies que não compartilham o DNA satélite pPh2004 podem ser formas derivadas, através de alterações ocorridas ou até mesmo perda deste DNA.

A ausência de dentes no gênero *Apareiodon* é considerada uma situação derivada em comparação aos demais gêneros da família Parodontidae. Assim, estudos

concomitantes utilizando DNA satélites e osteológicos poderiam ser utilizados nas análises cladísticas.

Os estudos apresentados neste trabalho com DNA satélite indicam dois agrupamentos, a presença deste DNA em todas espécies do gênero *Parodon* e a ausência em quase a totalidade das espécies analisadas do gênero *Apareiodon*, sugerindo a manutenção destes gêneros.

*V - A presença de *Apareiodon ibitinsis* na bacia do rio São Francisco*

Apareiodon sp. A (Britski,1988) era considerada uma nova espécie para a bacia do rio São Francisco. Exemplares de duas populações originadas do rio Piumhi e da região de Três Marias foram analisadas no presente estudo e demonstraram possuir as mesmas características cromossômicas de *Apareiodon ibitiensis* da bacia do Alto Paraná, confirmando a verdadeira identidade dos exemplares que compõem as populações do rio São Francisco. Pavanelli (2003) e Buckup (2007), em revisões taxonômicas, já haviam relatado a presença desta espécie para bacia do rio São Francisco.

VI - Invasão de espécies de Parodontidae através da Transposição do rio Piumhi

Após a caracterização cromossômica e confirmação das espécies *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon piracicabae* e *Parodon nasus* em distintas localidades da bacia do rio São Francisco (regiões de Três Marias e de transposição do rio Piumhi), foi

possível fazer um rastreamento citogenético das espécies de Parodontidae nesta bacia hidrográfica.

Por sua vez, a detecção e do rastreamento das espécies *A. ibitiensis*, *A. piracicabae* e *P. nasus* pode ser justificada através de conexões naturais e antrópicas entre as bacias do alto rio Paraná e do rio São Francisco. A conexão natural provavelmente pode ter ocorrido através do Pantanal do Piumhi nas épocas das cheias, pode ter servido de rota migratória para estes peixes, bem como a conexão antrópica através da transposição do rio Piumhi.

Das três espécie encontradas em simpatria no ribeirão Araras (região de transposição), duas delas - *Parodon nasus* e *P. hilarii* são morfologicamente semelhantes, entretanto, cromossomicamente distintas.

Ressalta-se que em revisão recente Pavanelli (2007) não foi incluído *Parodon nasus* para a bacia do rio São Francisco. Somente após o desenvolvimento do presente trabalho foi possível certificar da presença desta espécie para afluentes do alto São Francisco. Taxonomistas analisando estas duas espécies pretendiam considerar *P. hilarii* como sinonímia de *P. nasus*, por não obterem características morfológicas concisas para diferenciação destas duas espécie. Entretanto, após se familiarizarem com as grandes divergências cromossômicas e as pequenas diferenças morfológicas entre estas duas entidades, optaram por mantê-las como espécies distintas. Este é um exemplo da importância da citogenética como ferramenta na diferenciação de espécies morfologicamente semelhantes, denominadas como cripticas.

VII - Invasão de espécies de Gymnotiformes através da Transposição do rio Piumhi

No presente estudo, o citótipo A de *Eigenmannia virescens* e *Gymnotus sylvius*, encontradas apenas na bacia do alto rio Paraná foram identificadas na bacia do rio São Francisco, assim como algumas das espécies de Parodontidae.

Dois citótipo de *E. virescens* foram encontradas na bacia do rio São Francisco e não foi detectada a simpatria entre elas em nenhum dos pontos de coleta. Entretanto, *G. sylvius* foi detectada em simpatria com os diferentes citótipos de *E. virescens*, além de possuir uma maior dispersão, sendo encontrado em um maior número de rios. Diferentemente das eigenmannias, espécies do gênero *Gymnotus* são encontrados frequentemente em simpatria em diferentes bacias hidrográficas (Crampton et al 2005).

A citogenética aqui também foi de relevante importância na identificação e no rastreamento de diferentes citótipos de *E. virescens*, considerado um “complexo de espécies”, e portanto morfologicamente idênticos, e de *G. sylvius*, também muito semelhante a *G. carapo* (= *G. paraguensis*). Ressalta-se que este trabalho, trata-se da primeira identificação registrada de *G. sylvius* para a bacia do rio São Francisco. Conexões naturais através do Pantanal do Piumhi e a conexão antrópica através da transposição contribuíram para a transferência de espécies de Gymnotiformes da bacia do alto rio Paraná para a bacia do rio São Francisco.

Referências Bibliográficas

ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). **Electroreception**, 21, 360-409, 2005.

ALBERT, J. S. et al. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). **Systematic and Biodiversity**, 2, 375-417, 2005.

ALCARAZ, C.; VILA-GISPert, A.; GARCIA-BERTHOu, E. Profiling invasive fish species: the importance of phylogeny and human use. **Diversity and Distributions**, 11, 289-298, 2005.

ALMEIDA TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. **Ciência e Cultura**, 37, 448-453, 1985.

ALMEIDA TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, 111, 91-100, 2001.

ALMEIDA TOLEDO, L. F. et al. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes). **Cytogenetic Genome Research**, 97, 229-233, 2002.

AGOSTINHO, A. A.; JULIO JR, H. F.; PETRERE JR., M. Itaipu Reservoir (Brazil): impacts of the Impoundment on the Fish Fauna and Fisheries. In: COWX, I. G. **Rehabilitation of Freshwater Fishes**. Oxford, Fishing News Book, 1994, 171-184.

AGOSTINHO, A. A.; JULIO JR. H. F. Ameaça ecológica: peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, 21, 36-44, 1996.

AGOSTINHO, C. S.; JULIO JR., H. F. Observation of an invasions of piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the Upper Paraná River, Brasil. **Acta Scientiarum**, 24, 391-395, 2002.

AGOSTINHO, A. A. et al. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, 18, 299-306, 2002.

AGOSTINHO, C. S.; HAHN, N. S.; MARQUES, E. E. Patterns of food resource use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the upper Paraná river floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, 63, 177-182, 2003.

ALBERT, J. S.; MILLER R. R. *Gymnotus maculosus*: a new species of electric fish from Middle America (Teleostei: Gymnotoidei), with a key to the species of *Gymnotus*. **Proceedings Biological Society Washington**, 108, 662-678, 1995.

ALBERT, J. S.; CAMPOS-DA-PAZ, R. Phylogenetic systematics of America knifefishes: a review of the available data. In: MALABARBA, L. et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Museu de Ciências e Tecnologia, 1998.

ALBERT, J. S. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). **Miscellaneous Publications Museum Zoology**, 190, 1-129, 2001.

ALBERT, J. S. Family Sternopygidae (Glass knifefishes, Rattail knifefishes). In: REIS, E.; KULLANDER, S. O.; FERRARI JR., C. J. **Check List of the Freshwaters of South and Central América**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003.

ALBERT, J. S, et al. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). **Systematic and Biodiversity**, 2, 375-417, 2005.

ALVES-GOMES, J. A. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) According to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. In: MALABARBA, L. et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Museu de Ciências e Tecnologia, 1998.

ARTONI, R. F. et al. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution **Genetica**, 127, 277-284, 2006.

AZEVEDO, C. O.; BARBIERI, M. C.; BARBIERI, G. Ciclo reprodutivo de *Parodon tortuosus* (Eigenmann and Norris, 1900) do rio Passa-Cinco, Ipeúna - SP. Estádios de maturação do ovário. Época de reprodução. **Revista Brasileira de Biologia**, 48, 571-575, 1988.

BARBIERI, G.; VERANI, J. R.; BARBIERI, M. C. Análise do comportamento reprodutivo das espécies de *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879), *Apareiodon ibitiensis* Campos, 1944 e *Parodon tortuosus* Eigenmann & Norris, 1900 do rio Passa-Cinco, Ipeúna, SP (Pisces, Parodontidae). **Seminário Regional de Ecologia**. São Carlos, 1983, 3, 189-199.

BARBIERI, G. et al. Curva de maturação e fator de condição de *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879), *Apareiodon ibitiensis* (Campos, 1944) e *Parodon tortuosus*

(Eigenmann & Norris, 1900) do rio Passa-Cinco, Ipeúna - SP (Cypriniformes, Parodontidae). **Ciência e Cultura**, 37, 1178-1183, 1985.

BAREL, C. D. N. et al. Destruction of fisheries in Africa's lakes. **Nature**, 315, 19-20, 1985.

BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**, 28, 710-716, 2005.

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

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J Fish Biol**, 28, 153-159, 1986.

BLANCO, D. R. et al. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Rev Fish Biol Fisheries**, DOI 10.1007/s11160-009-9116-3, 2009.

BØHN, T. et al. Rapidly changing life history during invasion. **Okios**, 106, 138-150, 2004.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: **Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e Piscicultura**: Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, SP, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; 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**. Câmara dos Deputados, 1988, Coordenação de Publicações, CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, Brasília.

BUCKUP, P. A. Relationships of the characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi). In: MALABARBA, L. et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre: Museu de Ciências e Tecnologia, 1998.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007, 195 pp.

BULLOCK, T. H. et al. Aspectos do uso da descarga do órgão elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotodei e outros peixes amazônicos. **Acta Amazonica**, 9, 549-572, 1979.

CABRERO, J. et al. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. **Heredity**, 90, 377–381, 2003.

CAMPOS-DA-PAZ, R. Family Gymnotidae (Naked-back knifefishes). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C. J. **Check List of the Freshwaters of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

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

CENTOFANTE L. et al. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric Characidium fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, 138, 213–218, 2003.

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

COPP, G. H. et al. To be, or not to be, a non-native freshwater fish? **Journal of Applied Ichthyology**, 21, 242–262, 2005.

DEVLIN, R. H.; NAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, 208, 191–364, 2002.

DE LA HERRAN, R. et al. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular Biology of Evolution**, 18, 432–436, 2001.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, 56, 303-313, 2003.

DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). **Genetica**, 133,85–91, 2008.

EIGENMANN, C. H. Catalogue of the fresh water fishes of tropical and south temperate America. **Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia**. Princeton, 3, 375-511, 1910.

EIGENMANN, C. H. On *Apareiodon*, a new genus of characid fishes. **Annals of Carnegie Museum**, 10 (1-2), 71-76, 11-12, 1916.

ELTON, C. S. The Ecology of Invasions by Animals and Plants. Methuen. London, RU, 1958.

ELVIRA, B.; ALMODOVAR, A. . Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. **Journal of Fish Biology**, 59(supplement A), 323-331, 2001.

EWELL, J. J. et al. "Deliberate introductions of species: Research needs - Benefits can be reaped, but risks are high". **Bioscience**, 49, 619-630, 1999.

FERRO, D. A. M. et al. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S DNAr in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, 110, 55-62, 2001.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. Polymorphic nature of nucleolar organizer regions in fishes. **Cytogenetic Cell Genetics**, 11, 137-144, 1981.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, 49, 810-813, 1993.

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

FULLER, P. L.; NICO, L. G.; WILLIAMS, J. D. Nonindigenous fishes introduced into inland water of the United State. US Geological Survey, Bethesda, US, 1999.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 63, 378-383, 1969.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. **Cytogenetic Cell Genetics**, 43, 43-46, 1986.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) and their relationships in the phylogeny of the group. **Brazilian Journal Genetics**, 1, 135-140, 1987.

GALETTI JR., P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, 60, 375-382, 1995.

GALETTI, P. M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: GUERRA, M. **FISH - conceitos e aplicações na citogenética**. 2005, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

GARAVELLO, J. C. Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 37, 447-455, 1977.

GARCIA-BERTHOU, E. et al. Introduction pathways and establishments rates of invasive aquatic species in Europe. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 62, 453-463, 2005.

GOLD, J. R.; KAREL, W. J.; STRAND, M. R. Chromosomal formulae of North American fishes. **The Progressive Fish-Culturist**, 43, 10-23, 1980.

GOSLDSCHMIDT, T.; WITTE, F.; WANINK, J. Cascading effects of the introduced Nile perch on the detritivorous/phytoplanktivorous species in the sublittoral areas of Lake Victoria. **Conservation Biology**, 7, 686-700, 1993.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122, 239-244, 2004.

HAYES, K. R.; BARRY, C. S. Are there any consistent predictors of invasion success? *Biological Invasions* 10: 483-506. 2008

HEILIGENBERG, W. Eletrosensory system in fish. **Synapse**, 6, 196-206, 1990.

HENVEY, E.; KYNARD, B.; ZHUANG, P. Use of electronarcosis to immobilize juvenile lake and shortnose sturgeons for handling and the effects on their behavior. **Journal of Applied Ichthyology**, 18, 502-504, 2002.

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

HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of south american freshwater fish. **Journal of Biogeography**, 33, 1414-1436, 2006.

HUGES, N. F. A study of the Nile perch, an introduced predator in the Kavirondo Gulf, lake Victoria. Oxford University Nile perch project, Oxford, England, 1983.

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

JESUS, C. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica**, 105, 63-67, 1999.

JESUS, C. M. **Contribuições aos estudos citogenéticos da família Parodontidae (Pisces, Characiformes)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP, 1996.

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

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 11, 75-80, 2000b.

JESUS, C. M et al. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, 118, 25-32, 2003.

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

JORGE, L. C.; SANCHES, S.; MOREIRA-FILHO, O. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S y 5S y su utilización como marcadores citogenético-moleculares del polimorfismo cromosómico em *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Ciência e Técnica, Comunicações Científicas y Tecnológicas**, 37,1-4, 2001.

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

KANTEK D. L. Z. et al. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology** (submetido para publicação).

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, 56, 453-461, 2003.

KNER, R. Eine Uebersich der ichtyologischen Ausbeute dês Herrn Professors Dr. Mor. Wagner in Central-Amerika. Sitzungsber. Koningl. Bayer. **Akad. Wiss. Muenchen.**, 2, 220-230, 1863.

KOEHLER, M. R. et al. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. **Chromosome Research**, 5, 12-22, 1997.

KOLAR, C. S.; LODGE, D. M. Progress in invasion biology: predicting invaders. **Trends in Ecology & Evolution**, 16, 199-204, 2001.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, 409, 860-921, 2001.

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. **Cytogenetic Cell Genetic**, 26, 36-40, 1980.

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

LOVEJOY, N. R.; ARAUJO, L. G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, 9, 259-268, 2000.

LUNDBERG, J. G. et al. A major food web component in the Orinoco river channel: evidence from planktivorous electric fishes. **Science**, 237, 81-83, 1987.

MAISTRO, E. L. et al. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica**, 104, 1-7, 1998.

MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, 109, 161-168, 2000.

MANTOVANI, M. et al. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetic and Molecular Biology**, 27, 536-542, 2004.

MANTOVANI, M. et al. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, 109, 161-168, 2000.

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

MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetic and Molecular Biology**, 22, 357-361, 1999.

MARGARIDO, V. P.; BELLAFRONTE, E. MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brasil. **Journal of Fish Biology**, 70, 155-164, 2007.

MARTINEZ, J. L. et al. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenetic Cell Genetics**, 73, 149-152, 1996.

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

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

MARTINS, C.; WASKO, A. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. Chapter X. In: Focus on Genome Research. New York, 2004, Nova Science Publishers.

MENEZES, N. A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In **Poluição e Piscicultura**, São Paulo, 1970, Faculdade de Saúde Pública da USP, Secretaria da Agricultura, Instituto de Pesca, 216p.

MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, 85, 1-9, 2000.

MOLINA, W. F.; SCHIMD, M.; GALETTI JR. P. M. Heterocromatin and sex chromosomes in the neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios**, 94, 141-149, 1998.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas da ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, SP, 2007.

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

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

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

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

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyology** 3, 449-452, 2005.

MOREIRA-FILHO, O. Uma transposição de rio esquecida. **Revista UFG**, 2, 78-82, 2006.

MOYLE, P. B.; LIGHT, T. Biological invasions of fresh water: empirical rules and assembly theory. *Biological Conservation* **78**: 149-161. 1996

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. Ed. John Wiley Sons, New York, USA, 1994.

NELSON, J. S. *Fishes of the world*. Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, 2006.

NIRCHIO, M. et al. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genetic and Molecular Biology**, 30, 25-30, 2007.

NOMURA, H.; FERREIRA, M.; HAYASHI C. Caracteres Merísticos e dados Biológicos sobre o canivete *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1879) do rio Mogi Guaçu, São Paulo (Osteichthyes, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 38, 745-752, 1978.

NOMURA, H. Caracteres Merísticos e dados biológicos sobre o canivete *Parodon tortuosus* Eigenmann & Norris, 1900 do rio Mogi Guaçu, São Paulo (Osteichthyes, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 39, 451-456, 1979.

OBERDORF, T. et al. Development and validation of a fish-based index for the assessment of 'river health' in France. **Freshwater Biology**, 47, 1720-1734, 2002.

OLIVEIRA, R. R. et al. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, 13, 243-249, 2008.

OYAKAWA, O. T. et al. Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. 2006, São Paulo. Ed. Neotrópica.

PARDUE, M. L. Repeated DNA sequences in the chromosomes of higher organisms. **Genetics**, 79, 159-70, 1975.

PARKER, I. M. et al. Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. **Biol ogical Invasions**, 1, 3-19, 1999.

PAVANELLI, C. S. Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 1999.

PAVANELLI, C. S. Family Parodontidae (Parodonts). In: REIS, R. E.; SVEN, O. K.; FERRARIS JR., C. J. **Check List of the Freshwaters of South and Central América**, Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003. 46-50.

PAVANELLI, C. S. New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Copeia**, 89-95, 2006.

PAVANELLI, C. S. Família Parodontidae In: BUCKUP, P.A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, 2007, Museu Nacional do Rio de Janeiro.

PAZZA, R.; JULIO JR, H. F. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná River floodplain (Brazil). **Cytologia**, 68, 159-163, 2003.

PENDAS, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic Salmon. **Cytogenetic Cell Genetics**, 63, 128-130, 1993.

RAHEL, F. J. Homogenization of freshwater faunas. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 33, 291-315, 2002.

PERES, W.A.M. et al. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, 2009, DOI 10.1007/s10709-009-9389-4.

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

RAHEL, F. J. Homogenization of freshwater faunas. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 33, 291-315, 2002.

REICHARD, S. H.; HAMILTON, C. W. Predicting invasions of Woody plants introduced into North America. **Conservation Biology**, 11, 193-203, 1997.

RICHADSON, D. M. et al. Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. **Diversity and Distribution**, 6, 93-107, 2000.

ROBERTS, T. R. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (including Anodontidae) and Parodontidae. **Bull. Mus. Comp. Zool.** 146, 411-472, 1974.

ROSA, R. et al. Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S DNAr genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**, 128, 159-166, 2006.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome region in Anura. **Chromosoma**, 77, 83-103, 1980.
- RUDKIN, G. T.; STOLLAR, B. D. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. **Nature**, 265, 472-473, 1977.
- SAFFERY, R. et al. Conservation of centromere protein in vertebrates. **Chromosome Research**, 7, 261-265, 1999.
- SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, 131, 157-166, 2007.
- SAZIMA, I. Behavior of two Brazilian species of Parodontid fishes, *Apareiodon piracicabae* and *A. ibitiensis*. **Copeia**, 1, 166-169, 1980.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia: VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, 87, 327-344, 1982.
- SCHNEIDER, M. C. et al. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA₃/DA/DAPI staining. **Genetica**, 28, 333-346, 2006.
- SCHWEIZER, D.; LOID, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-bando patterns. **Chromosomes today**, 9, 61-74, 1987.
- SHAFLAND, P. L.; LEWIS, W. M. Terminology associated with introduces organisms. **Fisheries**, 9, 17-18, 1984.
- SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, 76, 67-112, 1982.
- SLAMOVITS, C. H. et al. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tucos-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. **Molecular Biology and Evolution**, 18, 1708-1719, 2001.
- SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Animal cytogenetic, v.3, Insecta 5. Coleoptera. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1978.
- SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae) I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, 60, 1-11, 1995.
- STRECKER, U. The impact of invasive fish on an endemic Cyprinodon species flock (Teleostei) from Laguna Chichancanab, Yucatan, Mexico. **Ecology Freshwater Fish** 15, 408-418, 2006.

- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Experimental Cell Research**, 75, 304-306, 1972.
- SUZUKI, H. et al. Variation in the distribution of silver-stained nucleolar organizing regions on the chromosomes of the wild mouse *Mus musculus*. **Molecular Biology and Evolution**, 7, 271-282, 1990.
- UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The Embo Journal**, 21, 5955-5959, 2002.
- THEBAUD, C. et al. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. *Ecology*, 77, 791-804, 1996.
- TRAVASSOS, H. Notas Ictiológicas. V. "*Apareiodon mogiguaçuensis*" n. sp. (Actinopterygii, Cypriformes, Characoidei). **Revista Brasileira de Biologia**, 12, 313-316, 1952.
- TRAVASSOS, H. Sobre um novo "Parodontidae" do estado de Goiás, Brasil (Cypriniformes, Characoidei). **Revista Brasileira de Biologia**. 17, 147-151, 1957.
- TURNER, T. F. Phylogeography and intraespecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to Rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, 64, 186-201, 2004.
- VALLENDER, E. J.; LAHN, B. T. Multiple independent origins of sex chromosomes in amniotes. **PNAS**, 103, 18031-18032, 2006.
- VENERE, P. C. et al. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**, 121, 75-80, 2004.
- VICARI, M. R. et al. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetics and Genome Research**, 114, 163-168, 2006.
- VICARI, M. R. et al. Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish, *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic Genome Research**, 122, 67-72, 2008.
- VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, 54, 365-369, 2001.
- VICENTE, V. E. et al. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**, 119, 115-120, 2003.
- WASKO, A. P.; GALETTI JR., P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetic and Molecular Biology**, 28, 135-138, 2000.

WASKO, A. P. et al. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, 44, 893-902, 2001.

WILLIAMS, J. D.; MEFFE, G. K. "Nonindigenous Species". Status and Trends of the Nation's Biological Resources. Reston, Virginia: United States Department of the Interior, Geological Survey, 1998.

WHITE, M. J. D. Animal Cytology and Evolution. Ed. Willian Claws & Sons, London. 1973.

WITTE, F.; GOUDSWAARD, P. C. Aspects of the haplochromine fishery in southern Lake Victoria. In: Report on the Third Session of the Sub-committee for the Development and Management of the Fisheries of Lake Victoria, FAO Fisheries Report 335, Rome, 1985.

WICHMAN, H. A. et al. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredit**, 82, 369-377, 1991.