

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ANAHIÊ BORTONCELLO PRESTES

Dinâmica evolutiva e mapeamento cromossômico dos genes de 5S rDNA em
Bryconamericus Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiinae, Diapomini) de
três bacias hidrográficas brasileiras

Maringá

2019

ANAHIÊ BORTONCELLO PRESTES

Dinâmica evolutiva e mapeamento cromossômico dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiinae, Diapomini) de três bacias hidrográficas brasileiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Maringá

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P936d Prestes, Anahiê Bortoncello
Dinâmica evolutiva e mapeamento cromossômico dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiidae, Diapomini) de três bacias hidrográficas brasileiras -- Anahiê Bortoncello Prestes -- Maringá, 2019. 142 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada - Área de Concentração: Interações Orgânicas, 2019.

1. AgRONS. 2. Bandamento C. 3. Evolução gênica. 4. Giemsa. 5. rDNA-FISH. I. Margarido, Vladimir Pavan, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Interações Orgânicas. III. Título.

CDD 21.ed. 597.4

AHS-CRB-9/1065

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANAHIÊ BORTONCELLO PRESTES

Dinâmica evolutiva e mapeamento cromossômico dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiinae, Diapomini) de três bacias hidrográficas brasileiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dra Alessandra Valéria de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2019.

Local de defesa: Sala 208, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

*Dedico este trabalho aos meus alicerces: meus pais, Aquiles e
Adriana, minhas irmãs Andressa e Ana Beatriz, e meu
namorado Diogo.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, à Coordenação, à Estela, e a todos os professores membros do programa, por todo o apoio e a construção de conhecimentos que juntos permitiram acontecer. Lembrarei sempre de cada um com carinho. Obrigada!!

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) *Campus* de Cascavel, por fornecer suporte físico para a realização da pesquisa.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por autorizar a captura dos peixes. À Unioeste, ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) e ao Parque Nacional do Iguaçu - Macuco Safari, pelo apoio logístico.

“Um homem sem amigos é uma terra sem umidade, uma manhã sem orvalho, um céu sem nuvens. Os amigos não são os que nos bajulam, mas os que desmistificam nosso heroísmo e revelam nossa fragilidade. Um intelectual sem amigos é um livro sem conteúdo.” (Augusto Cury). Deste modo, gostaria de agradecer a cada um dos amigos que fiz durante essa trajetória:

Ao meu orientador, professor Dr. Vladimir Pavan Margarido, pela confiança em mim depositada, pela realização das coletas, pelo apoio e dedicação no desenvolvimento da pesquisa, e por tudo o que me possibilitou aprender durante esses anos de mestrado.

Aos colegas do laboratório de Biologia e Conservação de Anamniotas da Unioeste: Aline, Simone, Leonardo, Lucas, Gabriela, Amanda, Luiz, Evandro, Samantha e Mariane, pelo auxílio e por todos os momentos compartilhados.

Às professoras Dr.^{as} Rafaela Maria Moresco e Jocicleia Thums Konerat, pelas boas conversas e sobretudo pelas risadas mesmo nos momentos difíceis. A amizade construída foi muito valiosa para a conclusão deste trabalho. Obrigada!!

Ao professor Dr. Roberto Laridondo Lui, pela amizade, diálogo e motivação! Por abrir minha mente para várias possibilidades, e sobretudo por ter confiado em mim durante a organização do XVIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes. Sou muito grata por todo o apoio e aprendizado. Obrigada!!

Ao professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pelo tempo dedicado em me auxiliar neste trabalho desde o XVIII SCGP. Sou imensamente grata por tudo!

À Aline Nardelli, por todos os momentos que pudemos compartilhar desde a graduação, tanto aqueles de angústia quanto os de euforia; por sempre fazer parte das minhas conquistas, ser minha irmã de coração e minha conselheira. Depois de 6 anos de amizade verdadeira, só tenho a dizer “Obrigada!”.

À Flavia, por ter me aguentado mesmo nos dias mais difíceis Kkkk. Sou muito grata por ter encontrado você em meu caminho!

À minha companheira de viagens nos quase 600 Km semanais entre Cascavel e Maringá, Gisele Arruda. Por todas as risadas, as músicas (e a Dolly kkk), os lanches “exóticos” no carro e os conselhos mútuos. Obrigada!!

À minha companheira fiel de trabalhos no PGB, Gabriela Navarro, por todo o aprendizado e os bons momentos vividos durante esses dois anos. Obrigada!!

Aos colegas da taxonomia de peixes da UEM, em especial ao professor Dr. Cláudio Henrique Zawadzki, ao Iago Penido, Gabriela Nardi, Gabriel Deprá, Augusto Frota e Helen Proença, pela amizade, pela acolhida no laboratório e sobretudo pelo café sagrado de cada intervalo de disciplina. Obrigada!!

Aos demais colegas de disciplinas, em especial à Aninha, Camila Avanci, Camila Sant’anna, Thaís, Rafael, Kátia, Priscila e Dirlei. Lembrarei de todos com carinho!

À minha família, fonte de apoio e motivação. Aos meus Pais, Aquiles e Adriana, por terem me ensinado valores e princípios, e me possibilitarem o estudo que nunca tiveram. Quem dera um dia ser tão sábia na vida quanto vocês! Não existem palavras suficientes para agradecer. Amo vocês!!

Às minhas irmãs, Andressa e Ana Beatriz, que também foram força e motivação para a conclusão dessa etapa. Amo vocês!!

Ao meu namorado Diogo, que foi peça-chave na conclusão deste trabalho. Por todas as vezes que me ouviu, me incentivou e me disse “não entendo sobre isso, amor, mas parece ser algo bom e fico feliz por você”. Sou imensamente grata por tudo, sobretudo por ter alguém tão especial quanto você para compartilhar meus dias. Te amo muito!!

A todos aqueles que, direta ou indiretamente estiveram envolvidos na realização deste trabalho e que eventualmente não foram citados, meu muito obrigada!!

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

(Augusto Cury)

Dinâmica evolutiva e mapeamento cromossômico dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiinae, Diapomini) de três bacias hidrográficas brasileiras

RESUMO

Bryconamericus é um gênero especioso de Characidae, embora poucos estudos citogenéticos tenham sido feitos neste grupo. Neste trabalho, quatro espécies de *Bryconamericus* foram caracterizadas citogeneticamente, sendo: duas populações de *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, bacia do Alto rio Uruguai/rio Iguaçu, bacia do Baixo rio Paraná), *B. coeruleus* (rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná), *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* (riacho Bigua, Bacia do Alto rio Uruguai). Todas as espécies apresentaram $2n=52$ cromossomos, com variação interpopulacional/interespecífica de fórmulas cariotípicas e número fundamental, corroborando o número diploide considerado basal para o gênero, e a ocorrência de rearranjos cromossômicos que atuam na dinâmica evolutiva deste grupo. Heterocromatinas foram evidenciadas nas regiões pericentromérica, telomérica e intersticial (em alguns cromossomos), e as AgRONS mostraram-se múltiplas, com variação intraespecífica, em *B. aff. iheringii* (Ijuí) e *B. coeruleus*; e simples para as demais espécies. A 18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONS em *B. aff. iheringii* (Iguaçu), e nas demais espécies evidenciou sítios extras. Os sítios de 5S rDNA foram evidenciados majoritariamente na região terminal do braço curto, muitas vezes co-localizados aos genes de 18S rDNA, com variação intraespecífica (em *B. aff. iheringii* (Ijuí) e *B. coeruleus*) e interespecífica quanto ao número de sítios. A caracterização molecular destes genes revelou a presença de duas variantes de 5S rDNA, uma correspondente às cópias funcionais (V1), compostas por 120 pb que abrigam regiões promotoras para a transcrição e que resultam num RNA com estrutura secundária em Y, e a outra (V2) compreendendo cópias truncadas (pseudogenes), com perdas nucleotídicas nos promotores internos, resultando num RNA com estrutura secundária sem funcionalidade aparente. Dois NTSs também foram observados: um com 82 pb altamente conservadas mesmo entre as espécies, e que contém sequências de reconhecimento importantes no processo de transcrição; e outro com composição nucleotídica variável e a ausência destas sequências. A presença de pseudogenes associada a ocorrência de dois tipos de NTSs, sugerem que em *Bryconamericus* a evolução dos genes de 5S rDNA envolve mecanismos mistos de Nascimento e Morte e Evolução Concertada. Este trabalho traz os primeiros dados citogenéticos para estas populações de *Bryconamericus*, sendo o primeiro estudo em *B. cf. eigenmanni*, além de contemplar a primeira caracterização dos genes de 5S rDNA e a proposição de mecanismos evolutivos para estes genes, auxiliando na compreensão deste grupo.

Palavras-chave: AgRONS, Bandamento C, Evolução gênica, Giemsa, rDNA-FISH.

Evolutionary dynamics and chromosomal mapping of 5S rDNA genes in *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (Characidae, Stevardiinae, Diapomini) from three Brazilian river basins

ABSTRACT

Bryconamericus is a speciose genus in Characidae, although few cytogenetic studies have been done in this group. In this work, four species of *Bryconamericus* were characterized cytogenetically, being: two populations of *B. aff. iheringii* (Ijuí River, Upper Uruguay River basin /Iguaçu river, Lower Paraná river basin), *B. coeruleus* (Piquiri river, Upper Parana River Basin), *B. cf. ecai* and *B. cf. eigenmanni* (Bigua stream, Upper Uruguay river basin). All species presented $2n=52$ chromosomes, with interpopulational/interspecific variation of karyotype formulas and fundamental number, corroborating the diploid number considered basal for the genus, and the occurrence of chromosomal rearrangements that act on the evolutionary dynamics of this group. Heterochromatins were evidenced in the pericentromeric, telomeric and interstitial regions (in some chromosomes), and the AgNORs showed multiple, with intraspecific variation, in *B. aff. iheringii* (Ijuí) and *B. coeruleus*; and simple for the other species. 18S rDNA-FISH confirmed the location of the NORs in *B. aff. iheringii* (Iguaçu), and in the other species showed extra sites. 5S rDNA sites were mostly found in the terminal short arm region, often co-localized to the 18S rDNA genes, with intraspecific variation (in *B. aff. iheringii* (Ijuí) and *B. coeruleus*) and interspecific in number sites. The molecular characterization of these genes revealed the presence of two variants of 5S rDNA, one corresponding to functional copies (V1), composed of 120 bp that harbor transcriptional promoter regions and which result in an RNA with secondary structure in Y, and the other (V2) comprising truncated copies (pseudogenes), with nucleotide losses in the internal promoters, resulting in an RNA with secondary structure without apparent functionality. Two NTSs were also observed: one with 82 bp highly conserved even among species, and containing important recognition sequences in the transcription process; and another with variable nucleotide composition and the absence of these sequences. The presence of pseudogenes associated with the occurrence of two types of NTSs suggests that in *Bryconamericus* the evolution of 5S rDNA genes involves mixed Birth-and-Death mechanisms and Concerted Evolution. This work presents the first cytogenetic data for these *Bryconamericus* populations, being the first study in *B. cf. eigenmanni*, besides contemplating the first characterization of the genes of 5S rDNA and the proposition of evolutionary mechanisms for these genes, helping in the understanding of this group.

Keywords: AgNORs, C-banding, Gene evolution, Giemsa, rDNA-FISH.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Fig. 1** Filogenia de Diapomini extraída de Mirande (2018) revelando o polifiletismo de *Bryconamericus* e a proximidade filogenética entre *B. exodon* e *B. stramineus*, bem como a concentração da maioria das espécies de *Bryconamericus* analisadas no clado *Nantis* 26
- Fig. 2** Representação esquemática dos elementos transponíveis. A: Transposons de DNA (Tipo II), autônomos (codificação de transposases) e não autônomos (derivados de mutação); B: elementos transponíveis de repetição invertida em miniatura; C: Transposons autônomos com replicação por círculo rolante; D: Retrotransposons LTR e Não-LTR. Modificado de Slotkin e Martienssen (2007). 32
- Fig. 3** Origem e características dos pseudogenes. Os éxons correspondem aos blocos em preto, intercalados por blocos em branco, os introns. As linhas em zigue-zague compreendem ao mRNA e ao cDNA oriundos da transcrição reversa, respectivamente (Modificado de D’Errico; Gadaleta; Saccone, 2004)..... 34
- Fig. 4** Processamento e maturação do pré-rRNA 45S, resultando na formação dos rRNAs 18S, 5.8S e 28S. Modificado de Cooper (2000) 36
- Fig. 5** Associação das proteínas ribossômicas aos rRNAs no nucléolo, formando as subunidades ribossômicas maior (60S) e menor (40S), compostas pelos rRNAs 28S+5.8S+5S, e 18S, respetivamente. Após a maturação, as partículas pré-ribossômicas são transportadas para o citoplasma, onde as subunidades tornam-se ativas. Extraído de Cooper (2000) 37
- Fig. 6** Arranjo dos genes de 5S rDNA na maioria dos eucariotos, intercalados com sequências de DNA não transcritas (NTS). Modificado de Martins e Wasko (2004) 38

CAPÍTULO 1

- Fig. 1** Cariótipos de *Bryconamericus* corados com Giemsa. Em destaque, nas caixas, os cromossomos portadores das RONS: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) - caixa I: padrão I; caixa II: padrão II; **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* - caixa I: padrão I; caixa II: padrão II; caixa III: padrão III; **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 µm..... 81

Fig. 2 Cariótipos de *Bryconamericus* C-bandados: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, padrão II); **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* (padrão II); **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 µm 81

Fig. 3 Cariótipos de *Bryconamericus* após *double-FISH* com sondas de 18S rDNA (verde) e 5S rDNA (vermelho). Em destaque, nas caixas, as variações intrapopulacionais que representam padrões distintos de localização dos genes ribossomais: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, padrão II) - caixa I: padrão I; **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* (padrão II) - caixa I: padrão I; caixa III: padrão III; **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 µm 82

Fig. 4 Ideograma comparativo das características citogenéticas das quatro espécies de *Bryconamericus*: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí), padrões I e II; **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus*, padrões I, II e II; **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni* 83

CAPÍTULO 2

Fig. 1 Alinhamento das sequências de 5S rDNA funcionais e NTS Tipo I das quatro espécies de *Bryconamericus*. Os nucleotídeos destacados em cinza compreendem as regiões essenciais para a transcrição gênica e formação do 5S rRNA funcional: uma sequência curta similar a TATA (*TATA-like*, -32), um Box GC (-10), um resíduo C (-1), um Box A (+49), um Elemento Intermediário (EI, +70), um Box C (+81), além do Terminador Poli-T (+120)..... 123

Fig. 2 Alinhamento comparativo entre a sequência consenso funcional de 5S rDNA (V1) de *Bryconamericus*, construída a partir das sequências consenso de cada espécie/população, e os pseudogenes encontrados em *B. coeruleus* (pseudogenes 1 e 2), e *B. aff. iheringii* (pseudogenes 3, 4 e 5) (V2). Os quadros indicam a localização estimada dos promotores internos para RNA polimerase III, evidenciando a ocorrência de deleções nos pseudogenes em relação ao gene funcional (5S rDNA consenso *Bryconamericus*) 123

Fig. 3 Fragmento com 555 pb de *Bryconamericus aff. iheringii* do rio Iguaçu, evidenciando a presença de 48 pb referentes ao gene de 5S rDNA inicial, seguido por duas cópias funcionais deste gene (120 pb + 3 timinas terminais pertencente ao NTS, em azul), intercaladas entre si por espaçadores não transcritos (NTS tipo I, em cinza, e NTS tipo II, em verde). O último NTS (NTS tipo II) da sequência apresenta uma inserção de 45 pb correspondentes ao filamento complementar invertido do elemento transponível *hAT* de *Drosophila kikkawai* (*hAT-2_DK*, em vermelho)..... 124

Fig. 4 Estrutura secundária dos 5S rRNAs de *Bryconamericus*: **A** Estrutura consenso para o gênero, evidenciando a estrutura em Y característica deste gene, com a presença de cinco hélices (I-V), sete alças (A-G) e um ponto de articulação; **B** e **C** Estruturas

construídas a partir de pseudogenes encontrados em *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) e *B. coeruleus*, respectivamente 124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tab. 1 Espécies de *Bryconamericus* coletadas e os respectivos locais de coleta. ♂ = Machos, ♀ = Fêmeas, NUP = Números de comprovação de depósito na Coleção Ictiológica do Nupélia. 78

Tab. 2 Revisão dos dados citogenéticos em *Bryconamericus*. ^aNúmero diploide; ^bNúmero Fundamental; ^cNúmero de cístrons de 18S rDNA; ^dNúmero de cístrons de 5S rDNA; PR = Estado do Paraná; RS = Estado do Rio Grande do Sul; SC = Estado de Santa Catarina; SP = Estado de São Paulo; *Citado como *B. aff. iheringii*; C = Centromérica, T = Telomérica, T* = Terminal, I = Intersticial. 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Bacia hidrográfica do rio Uruguai.....	17
2.2 Bacia hidrográfica do rio Paraná: Alto e Baixo rio Paraná.....	18
2.3 Considerações em Characiformes e Characidae.....	20
2.4 Filogenia de Characidae com ênfase em <i>Bryconamericus</i>	22
2.5 Estudos citogenéticos em <i>Bryconamericus</i>	26
2.6 Famílias Multigênicas	28
2.6.1 Origem e caracterização das famílias multigênicas	28
2.6.2 Famílias multigênicas: DNAs ribossomais (rDNAs)	35
2.6.3 Evolução das famílias multigênicas.....	38
2.6.3.1 <i>Mecanismos de evolução das famílias multigênicas: Evolução Concertada.....</i>	39
2.6.3.2 <i>Mecanismos de evolução das famílias multigênicas: Evolução por Nascimento-Morte.....</i>	41
2.6.3.3 <i>Mecanismos mistos de evolução de famílias multigênicas: O caso do 5S rDNA</i>	44
3. REFERÊNCIAS	46

CAPÍTULO 1 Marcadores citogenéticos como ferramentas na delimitação de espécies em um grupo de peixes neotropicais altamente diverso	58
Resumo.....	60
Introdução	61
Materiais e Métodos	63
Resultados	64
Discussão	67
Agradecimentos.....	71
Referências.....	72
ANEXO 1.....	84

CAPÍTULO 2 Caracterização molecular sugere o envolvimento de mecanismos mistos na evolução dos genes de 5S rDNA em <i>Bryconamericus</i> (Characidae: Stevardiinae)	100
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Resumo.....	102
Destaques do manuscrito.....	103
Abreviações.....	103
1 Introdução	104
2 Material e Métodos	106
2.1 Amplificação, sequenciamento e análise das sequências de 5S rDNA	107
3 Resultados	107
3.1 Caracterização dos genes de 5S rDNA	107
3.2 Estrutura secundária para o 5S rRNA	109
4 Discussão	109
5 Agradecimentos.....	114
6 Referências.....	115
ANEXO 2.....	124

1. INTRODUÇÃO

Os peixes compreendem cerca de 32.000 espécies, distribuídas em 85 ordens e 536 famílias; pouco mais da metade das mais de 60.000 espécies de vertebrados vivos conhecidas; cuja morfologia, biologia e habitats apresentam ampla diversificação, desde as feiticeiras e lampreias, até os tubarões, peixes pulmonados e *flatfishes*. A diversificação adaptativa entre os peixes confere a este grupo a capacidade de ocupar os mais variados ambientes aquáticos, tornando-os importantes no estudo da variabilidade genética e evolução (NELSON et al., 2016).

A região Neotropical recebe grande destaque por apresentar a maior riqueza ictiofaunística e diversidade funcional das espécies de peixes dentre as regiões biogeográficas (TOUSSAINT et al., 2015). Segundo Reis (2003), esta região contava com aproximadamente 6.000 das 13.000 espécies estimadas para o planeta, das quais 4.475 foram consideradas como espécies válidas e cerca de 1.550 como conhecidas, porém não descritas formalmente. De acordo com Reis et al. (2016), estes números vêm sendo ampliados ao longo dos anos devido ao grande número de descrições: cerca de 102 por ano para espécies de peixes de água doce no período de 2006 a 2016, de forma que estes autores estimaram uma riqueza que varia entre 8.000 e 9.000 espécies de peixes dulcícolas, e cerca de 4.000 espécies de peixes marinhos (23% das 17.300 espécies marinhas válidas atualmente). Segundo Ribeiro (2006), a grande diversidade da ictiofauna desta região decorre tanto de fatores históricos quanto de fatores ecológicos, os quais resultam de milhares de anos de evolução desde a ruptura da Gondwana até o presente momento.

Dentre as ordens de peixes, Characiformes é uma das mais numerosas da região Neotropical, com 2.214 espécies alocadas em 24 famílias, sendo elas: Citharinidae, Distichodontidae, Crenuchidae, Alestidae, Hepsetidae, Tarumaniidae, Erythrinidae, Parodontidae, Cynodontidae, Serrasalminidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Lebiasinidae, Ctenoluciidae, Chalceidae, Triportheidae, Gasteropelecidae, Bryconidae, Iguanodectidae, Acestrorhynchidae, e Characidae (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2018).

Em Characiformes, Characidae é a família mais representativa, com 1.181 espécies válidas alocadas em nove subfamílias (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2018), e a característica de englobar grupos que exibem lacunas em suas relações morfológicas e sistemáticas. É o caso de *Bryconamericus*, um dos gêneros mais numerosos de Characidae com 56 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2018), e que ainda aparece como polifilético em Stevardiinae (THOMAZ et al., 2015; MIRANDE, 2018). Esta

condição reflete a necessidade de estudos genéticos e citogenéticos como auxílio para a elucidação dessas questões, visto que o material genético está contido nos cromossomos e que grande parte das alterações genéticas são significativas na inferência de processos evolutivos (GUERRA, 1988).

O presente trabalho objetiva a caracterização citogenética comparativa de quatro espécies de *Bryconamericus*, sendo *B. coeruleus* (rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná), *B. cf. ecai* (riacho Bigua, bacia do Alto rio Uruguai), *B. cf. eigenmanni* (riacho Bigua, bacia do Alto rio Uruguai), e duas populações de *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, bacia do Alto rio Uruguai / rio Iguaçu, bacia do Baixo rio Iguaçu) através das técnicas de coloração por Giemsa, impregnação por nitrato de prata para a identificação das RONS (regiões organizadoras de nucléolos), Bandamento C para a caracterização da distribuição de heterocromatina, e FISH (hibridização *in situ* fluorescente) com sondas de 5S e 18S rDNAs para a verificação da localização dos sítios destes genes nos cromossomos. De maneira complementar, o trabalho contempla a primeira descrição molecular dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus*, com ênfase para a construção de uma estrutura secundária atestando ou não a sua funcionalidade, e a proposição de mecanismos envolvidos na dinâmica evolutiva destes genes no grupo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacia hidrográfica do rio Uruguai

O rio Uruguai nasce na Serra Geral a partir da confluência dos rios Pelotas e Canoas, na fronteira entre os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e percorre um trecho de 2.200 Km de extensão até a sua foz, quando junto com os rios Paraná e Paraguai, forma a bacia hidrográfica do Prata (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006). Quando o rio Uruguai conflui com o rio Paperi-Guaçu, estabelece o limite entre o Brasil e a Argentina e, depois de receber a afluência do rio Quaraí, que limita o Brasil e o Uruguai, marca a fronteira entre a Argentina e o Uruguai até sua foz (PAIM; ORTIZ, 2006). A área total drenada pelo rio, que se configura na Bacia Hidrográfica do Rio Uruguai compreende aproximadamente 385.000 km², dos quais 45% (174.412 Km²) estão situados em território nacional (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006). Os principais afluentes do rio Uruguai no Brasil são os rios Canoas, Pelotas, Passo Fundo, Chapecó, Ijuí, Ibicuí e Quaraí; na Argentina os rios Aguapey, Miriñiay e Gualaguaychu, e no Uruguai os rios Daymán, Queguay e Negro (PAIM; ORTIZ, 2006).

A formação geológica da bacia do rio Uruguai é a mais recente dentre os rios da bacia do Prata, com seu sistema hidrográfico formado sobre as rochas sedimentares e vulcânicas que compõem a bacia do Paraná. As regiões correspondentes ao curso superior e médio possuem uma barreira significativa com apenas uma pequena várzea que gradualmente se afunila em direção à cabeceira, características estas que influenciam diretamente a diversidade e a abundância de peixes (DI PÉRSIA; NEIFF, 1986). Segundo Paim e Ortiz (2006), a diversidade biológica desta bacia hidrográfica é formada pelos principais biomas do sul da América Latina: a Mata Atlântica e seus ecossistemas associados (floresta ombrófila mista, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual e campos naturais) e o Pampa, os quais estão em processo de fragmentação devido ao extenso impacto gerado pelos empreendimentos hidrelétricos. Por suas dimensões, a área da bacia corresponde a um dos mais importantes corredores de biodiversidade do Cone Sul, apresentando em sua fauna diversas espécies endêmicas ou em vias de extinção.

A bacia hidrográfica do Uruguai compreende o Alto, Médio e Baixo rio Uruguai. O Alto rio Uruguai compreende uma área de 76.209 Km², com relevo de grande declividade e alto potencial hidrelétrico (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006). Um dos principais afluentes do rio Uruguai nesta extensão é o rio Ijuí, situado a norte-noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com uma área de 10.703,78 Km², que abrange municípios como Cruz Alta, Ijuí, Santo Ângelo e Tupanciretã, na província geomorfológica do Planalto Meridional

(SEMA-RS, 2018). Os principais afluentes do rio Ijuí são os rios Ijuizinho, Conceição, Potiribu, Caxambu, Faxinal, Fiúza e Palmeira (FEPAM, 2018), e apresenta uma riqueza ictiofaunística caracterizada pela presença de mais de 77 espécies, sendo Loricariidae, Characidae e Cichlidae as famílias mais representativas (FERREIRA; HARTMANN; BEUTER, 2011).

Em Santa Catarina, um dos principais afluentes do rio Uruguai em seu curso superior é o rio das Antas, cuja bacia hidrográfica situa-se no extremo-oeste do Estado, com uma extensão de 6.015,57 Km², abrangendo municípios como Campo Erê, Saltinho, Bom Jesus do Oeste, Tigrinhos, Maravilha, Cunha Porã, Cunhataí, São Carlos e Iraceminha (ÁGUAS-SC, 2018), no qual encontra-se o riacho Bigua, um dos pontos de coleta deste trabalho.

A ictiofauna do Alto rio Uruguai tem declinado consideravelmente a medida que novos represamentos são feitos na região, que possui inclinação acentuada ideal para a instalação de usinas hidrelétricas na calha principal do rio Uruguai, alterando o hábitat, a diversidade e a estrutura das espécies de peixes nesse ambiente. O levantamento ictiofaunístico a longo prazo realizado em 2014, resultou num total de 105 espécies, distribuídas em 07 ordens e 22 famílias, e evidenciou a perda de riqueza que sucede o represamento (SILVA, 2014), mostrando a necessidade de se monitorar a biodiversidade local e mitigar danos que possam ser previstos a longo prazo.

2.2 Bacia hidrográfica do rio Paraná: Alto e Baixo rio Paraná

O rio Paraná nasce na serra da Mata da Corda, no Estado de Minas Gerais, após a confluência dos rios Grande e Paranaíba, e desemboca no estuário do rio da Prata (LOWE-MCCONNEL, 1999) percorrendo cerca de 1.900 Km em território brasileiro, com desnível total de quase 1.000 metros e drenando cerca de 891.000 Km² (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1999). Os principais afluentes do rio Paraná são os rios Grande, Paranaíba, Tietê, Paranapanema, Iguaçu e Piquiri, este localizado na região do Alto rio Paraná. Quase toda a extensão da bacia encontra-se em território brasileiro, à exceção de um trecho dentro do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, o qual faz fronteira com o Paraguai (AGOSTINHO; GOMES, 2002).

Segundo Agostinho, Gomes e Pelicice (2007), a bacia hidrográfica do rio Paraná sofre com a grande ação antrópica, visto que sua extensão comporta as áreas de maior densidade populacional, industrialização e atividades agrícolas do Brasil, além de ser intensamente explorada pelos aproveitamentos energéticos, fornecendo cerca de 70% da

energia elétrica produzida no país, e acarretando numa área alagada de aproximadamente 16.700 Km², o que representa quase metade de toda a água represada no país.

O rio Paraná, em seu curso superior, é tido como o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul, com cerca de 3,2 milhões de Km², incluindo toda a drenagem do rio Paraná a montante da Usina Hidrelétrica de Itaipu (antigo Salto de Sete Quedas) (GRAÇA; PAVANELLI, 2007; SALLUN; SUGUIO; STEVAUX, 2007), e assim como o Alto rio Uruguai, apresenta grande potencial hidrelétrico e represamentos (AGOSTINHO; GOMES, 2002). Neste contexto o rio Piquiri, que representa um dos últimos tributários livres de barramentos e é amplamente utilizado pelas espécies de peixes como habitat natural, passa a ter sua importância aumentada (IAP, 2008a).

O rio Piquiri apresenta várias corredeiras em seus 660 Km de extensão, representadas por pequenas quedas e trechos estreitos, com diferença de mais de 1.000 metros entre a sua nascente na Serra do São João, na divisa entre os municípios Turvo e Guarapuava, até sua foz no rio Paraná (AGOSTINHO; JÚLIO-JUNIOR, 1999). Segundo Gubiani et al. (2010), a confluência dos rios Piquiri e Paraná ocorre no maior trecho do rio Paraná em território nacional, que fica acima do reservatório de Itaipu (barragem concluída em 1982) e abaixo da barragem de Porto Primavera (concluída em 1998). Ao longo do percurso entre a nascente e a foz, o rio Piquiri recebe as águas dos rios Cobre, Bandeira, Cascudo, Feio, São Francisco, Tourinho, Melissa, Jesuítas, Verde, Encanto e Azul, pela margem esquerda, e dos rios Cantu, Sapucaí, Goio Bang, Goio-erê, Jangada e Xambré, pela margem direita (IAP, 2008b). A bacia hidrográfica do rio Piquiri possui uma grande riqueza ictiofaunística, abrigando muitas espécies raras, ameaçadas de extinção, migratórias, endêmicas e muitas ainda não descritas (CAVALLI et al., 2018).

De acordo com Langeani et al. (2007), a ictiofauna do Alto rio Paraná compreendia a aproximadamente 310 espécies, distribuídas em 38 famílias e 11 ordens, sendo Siluriformes e Characiformes as mais representativas. Graça e Pavanelli (2007) relataram um total de 09 ordens, 35 famílias, 114 gêneros e 182 espécies na região da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes, números que foram revistos e modificados por Ota et al. (2018), para um total de 10 ordens, 41 famílias, 126 gêneros e 211 espécies, com a descrição de quatro novos gêneros, cinco sinonimizáveis e doze espécies descritas recentemente. Entretanto, pouco se conhece sobre a riqueza das espécies de peixes nos afluentes do rio Paraná, o que leva a crer que os números de riqueza de espécies na região do Alto rio Paraná sejam maiores do que os relatados até então (CAVALLI et al., 2018).

O rio Piquiri apresenta uma ictiofauna consideravelmente diferente da encontrada no restante da bacia, tanto por englobar um menor número de espécies, quanto por variar na composição e abundância destas (GUBIANI et al., 2006). O levantamento feito por Gubiani et al. (2006) revelou a presença 62 espécies de peixes distribuídas em 5 ordens e 21 famílias, aumentando para 69 espécies pertencentes a 4 Ordens e 19 famílias no levantamento feito por Gubiani et al. (2010). Estes números foram ampliados por Cavalli et al. (2018) para 152 espécies (muitas das quais não-nativas) distribuídas em 8 ordens, 31 famílias e 89 gêneros, com destaque para Siluriformes e Characiformes, cujas espécies registradas corresponderam a cerca de 84% do número total.

A Usina Hidrelétrica de Itaipu, localizada no município de Foz do Iguaçu, estabelece o limite entre o Alto rio Paraná e o Baixo rio Paraná, cerca de 150 metros à jusante da antiga barreira natural, o Salto de Sete Quedas (LANGEANI et al., 2007). Assim, a bacia do Baixo rio Paraná se estende desde a Usina Hidrelétrica de Itaipu até a conexão com o rio Paraguai. Esta região também recebe águas do rio Iguaçu, que é considerado o maior rio totalmente paranaense, e tem sua origem a partir da confluência dos rios Iraí e Atuba, na divisa entre os municípios de Curitiba e Pinhais, cruzando os três planaltos paranaenses até desaguar no rio Paraná (SEMA, 2010). O rio Iguaçu tem sua comunidade ictiofaunística dividida pela presença das Cataratas do Iguaçu, onde a porção à montante das Cataratas é denominada bacia do Baixo rio Iguaçu, e a porção à jusante, bacia do Baixo rio Paraná (PAIZ, 2013).

A diversidade ictiológica do rio Iguaçu foi estimada por Ingenito, Duboc e Abilhoa (2004) como sendo composta por 84 espécies, mas este número foi ampliado por Baumgartner et al. (2012) para 106 espécies de peixes apenas na região do Baixo rio Iguaçu. Por se tratar de uma área de preservação fiscalizada por órgãos ambientais e, portanto, de difícil acesso, são raros os trabalhos realizados no trecho jusante às Cataratas do Iguaçu até sua foz no rio Paraná (PAIZ, 2013), justificando a carência de dados atuais sobre a riqueza ictiofaunística deste rio.

2.3 Considerações em Characiformes e Characidae

Characiformes compreende uma das ictiofaunas de maior diversidade e representatividade, com espécies que ocorrem na África, no sudoeste dos Estados Unidos, México, e Américas Central e do Sul (NELSON, 2006, NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Composta por 24 famílias e aproximadamente 2.203 espécies (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2018), Characiformes compreende espécies que variam desde 26mm (WEITZMAN; VARI, 1988), como as pertencentes aos gêneros *Lepidarchus* e *Xenobrycon*,

até outras com mais de um metro de comprimento padrão, como as dos gêneros *Hydrocynus* e *Salminus* (MOREIRA, 2007). Trata-se de peixes exclusivamente dulcícolas, que ocupam ambientes lóticos e lênticos (NELSON, 2006), os quais apresentam diferentes hábitos alimentares: desde espécies carnívoras (*Serrasalmus* sp.); iliófagas (espécies de Prochilodontidae e Citharinidae); herbívoras (*Colossoma* sp., p. ex.); e lepidófagas (*Catoprion*, p. ex.), até outras que se alimentam de pedaços de nadadeiras de outros peixes (Distichodontidae: *Eugnathichthys* e *Phago*, p. ex.) (MOREIRA, 2007). O confinamento dos Characiformes em seus habitats tem feito deste um interessante grupo modelo para diversos estudos biogeográficos (ORTÍ; MEYER, 1997).

Segundo Nelson, Grande e Wilson (2016), Characiformes subdivide-se em duas subordens: Citharinoidei (africana), que inclui duas famílias com 20 gêneros e cerca de 109 espécies; e Characoidei (americana), que contempla a grande maioria dos táxons (cerca de 22 famílias, 500 gêneros e mais de 2.200 espécies). Em Characoidei está Characidae, uma das principais famílias de Characiformes, com 1.181 espécies válidas, das quais mais de 900 são alocadas em 09 subfamílias (Aphyoditeinae, Spintherobolinae, Exodontinae, Stethaprioninae, Tetragonopterinae, Characinae, Aphyocharacinae, Cheirodontinae, Stevardiinae) e aproximadamente 37 espécies válidas ainda permanecem sem subfamília definida, sendo classificadas como *incertae sedis* (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2018).

Segundo Mirande (2018), Characidae está em quarto lugar em número de espécies dentre os peixes actinoptérgios, sendo superada apenas por Cyprinidae, Gobiidae e Cichlidae, mesmo tendo uma distribuição geográfica mais restrita do que estas. Trata-se da família mais diversa dentre os peixes neotropicais (MIRANDE, 2010; 2018), com espécies de portes variados que ocupam as principais bacias hidrográficas, além de populações isoladas em riachos (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). De acordo com Paiz (2013), Characidae compreende a maioria dos peixes de escamas popularmente conhecidos como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus e peixes-cachorro, que apesar de seu porte reduzido possuem grande importância econômica e relevância ambiental, por constituírem um elo na cadeia alimentar. Algumas espécies de caracídeos, principalmente as do gênero *Hemimigramus*, são também mantidas como peixes ornamentais e são popularmente conhecidos como “tetras” (MIRANDE, 2018).

A morfologia do caracídeos mantém-se bastante conservada e as variações encontradas referem-se basicamente a eventos de miniaturização e a hábitos ecológicos distintos, como a reprodução e alimentação (MIRANDE, 2010). A miniaturização refere-se à ocorrência de espécies de caracídeos que possuem menos de 26mm de comprimento total, a

maioria com caracteres redutivos como a perda de canais sensoriais ou ossos, e que são comuns em algumas regiões tropicais da América do Sul (MIRANDE, 2018), como é o caso de *Cyanogaster noctivaga* (Ostariophysii) (MATTOX et al., 2013) e *Priocharax nanus* (Ostariophysii) (TOLEDO-PIZA; MATTOX; BRITZ, 2014), ambas encontradas no Rio Negro, bacia do rio Amazonas.

De acordo com Mirande (2018), a morfologia conservada dos caracídeos e as numerosas características variáveis relacionadas à ecologia das espécies (como a predação), eventos convergentes que derivam de um único processo evolutivo (como a miniaturização), e a presença de características autapomórficas ou especializadas, tem tornado cada vez mais difícil o processo de descrição de caracteres morfológicos que sejam relevantes para a filogenia de Characidae; daí a necessidade de se buscar metodologias que auxiliem na busca por novos dados que venham a fornecer suporte na resolução das várias problemáticas ainda encontradas nesta família.

2.4 Filogenia de Characidae com ênfase em *Bryconamericus*

A maioria das famílias em Characiformes exibem relações claras de monofiletismo (MALABARBA; WEITZMAN, 2003; CALCAGNOTTO et al., 2005), enquanto algumas englobam grupos que exibem lacunas em suas relações morfológicas e sistemáticas, como é o caso de Characidae. Weitzman e Malabarba (1998) atribuíram a dificuldade de classificação em Characidae principalmente ao porte reduzido da maioria das espécies do grupo, o que confere redução no sistema da linha lateral, na complexidade do sistema esquelético, no número de raios das nadadeiras, na quantidade de escamas e no tamanho dos olhos em relação à cabeça, dificultando a classificação taxonômica.

Reis (2003) listaram 12 subfamílias para Characidae, para as quais encontraram evidências de monofiletismo. Estudos complementares de Lima et al. (2003) deixaram 88 gêneros e 620 das pouco mais de 900 espécies de caracídeos conhecidas até então em *incertae sedis*, um grupo artificial caracterizado por englobar táxons com relações filogenéticas pouco conhecidas. Estudos mais recentes alocaram muitos destes gêneros dentre as 9 subfamílias de Characidae, de forma que hoje apenas 37 espécies válidas continuam em *incertae sedis* (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2018).

Uma filogenia para Characidae começou a ser elaborada por Malabarba e Weitzman (2003), tendo como base quatro características osteológicas: 1 - presença de ganchos ósseos nas nadadeiras; 2 - ausência do osso supra-orbital; 3 - presença de dois raios não ramificados e oito raios ramificados na nadadeira dorsal; e 4 - presença de quatro dentes na fileira dentária

interna da pré-maxila. Os dois últimos caracteres compreenderam sinapomorfias do que os autores denominaram como ‘Clado A’, o qual compreendia 20 dos 88 gêneros definidos por Lima et al. (2003) como *incertae sedis*, além de espécies pertencentes às subfamílias Glandulocaudinae e Stevardiinae.

Mirande (2009, 2010) adicionou dados morfológicos ao estudo das relações filogenéticas em Characidae, analisando 360 caracteres em 160 espécies e famílias relacionadas. Em decorrência, o autor confirmou o monofiletismo de Characidae apoiado em 7 sinapomorfias: 1 - orbitosfenoide delgado e distante do parasfenoide; 2 - presença de rinosfenoide, 3 - mais de 40 vértebras; 4 - mais de 24 raios ramificados na nadadeira anal; 5 - raios anteriores da nadadeira caudal fundidos em placas verticais; 6 - raios das escamas confluentes ao centro; e 7 - tendão adutor mandibular da seção A1 parcialmente ligado ao quadrante.

Mirande (2009) também propôs uma nova subfamília, Heterocharacinae, redefiniu as subfamílias Aphyocharacinae, Aphyoditeinae, Characinae, Gymnocharacinae e Stevardiinae, e alocou nesta a subfamília Glandulocaudinae, os membros remanescentes do ‘Clado A’ de Malabarba e Weitzman (2003) e os gêneros *Aulixidens* e *Nantis*. A maioria dos gêneros *incertae sedis* foram atribuídos provisoriamente a um clado filogeneticamente diagnosticado. Deste modo, Characidae seria composta pelos clados Bryconinae, Iguanodectinae + *Bryconops*, Heterocharacinae, Tetragonopterinae + Stethaproninae, Rhoadsiinae + Clado *Bramocharax*, Characinae, Clado *Astyanax* (que alocava ‘*Bryconamericus scleroparius*’, hoje válido como *Eretmobrycon scleroparius*), Gymnocharacinae + *Nematobrycon*, Aphyocharacinae, Aphyoditeinae, Cheirodontinae e Stevardiinae. O clado Stevardiinae abrigava, entre outras, as demais espécies de *Bryconamericus* analisadas: *B. cf. iheringii*, *B. mennii*, *B. cf. rubropictus*, *B. rubropictus*, *B. thomasi* (válido como *Piabina thomasi*), *B. agna* e *B. beta* (sinônimo de *Knodus alpha*).

Dados moleculares foram acrescentados à família por Javonillo et al. (2010) e Oliveira et al. (2011), a partir de análises de sequências de DNA de três genes mitocondriais (12S, 16S e genes COI) e um gene nuclear (RAG2) em 98 táxons, e de dois genes mitocondriais (16S e CYT B) e três genes nucleares (MYH6, RAG1 e RAG2) em 166 táxons, respectivamente. Javonillo et al. (2010) verificaram três clados em Characidae, denominados ‘Clado A’, ‘Clado B’ e ‘Clado C’, sendo o último considerado grupo irmão de ‘A+B’. No ‘Clado A’ foram agrupadas as subfamílias Glandulocaudinae e Stevardiinae, e nove gêneros *incertae sedis*: *Bryconadenos*, *Bryconamericus*, *Cyanocharax*, *Diapoma*, *Hemibrycon*, *Hypobrycon*, *Knodus*, *Odontostoechus* e *Piabina*, totalizando 250 espécies. No ‘Clado B’

estavam quatro subfamílias: Characinae, Cheirodontinae, Aphyocharacinae e Tetragonopterinae, totalizando cerca de 150 espécies; enquanto o Clado C era o mais numeroso, pois continha quatro gêneros que juntos representavam mais de 350 espécies: *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia* e *Hemigrammus*.

Os dados do Clado A de Javonillo et al. (2010) foram muito similares aos obtidos por Malabarba e Weitzman (2003), e apoiam o monofiletismo de Glandulocaudinae, apresentando Stevardiinae como polifilético. No entanto, apesar das análises de filogenia terem apoiado a monofilia do Clado, o mesmo não foi verificado para alguns gêneros, como *Bryconamericus*, que foi representado por quatro espécies e pareceu polifilético, e *Hypobrycon*, *Knodus*, *Cyanocharax*, e *Gephyrocharax*, que não puderam ser afirmados como grupos monofiléticos. Nesta classificação, *Bryconamericus* permaneceu como *incertae sedis* dentro do Clado A.

Os resultados de Oliveira et al. (2011) demonstraram o chamado Clado 55, que correspondia parcialmente ao Clado A de Malabarba e Weitzman (2003), e continha duas subfamílias: Glandulocaudinae (monofilética) e Stevardiinae (polifilética), corroborando o proposto por Javonillo et al. (2010). Dentro de Stevardiinae, as duas espécies de *Bryconamericus* analisadas, *B. exodon* e *B. emperador* (hoje *Eretmobrycon emperador*) evidenciaram o polifiletismo do gênero, já que *B. exodon* mostrou-se mais proximamente relacionado a *Odontostoechus* e *Hypobrycon* do que a seu congênera nominal.

Thomaz et al. (2015) realizaram o estudo filogenético mais amplo para a subfamília Stevardiinae, onde foram amostrados 355 indivíduos de 153 prováveis espécies distribuídas em 32 gêneros, com o intuito de abordar a monofilia do grupo através da análise de sete fragmentos de genes, sendo três mitocondriais (mtDNA: 12S, 16S e COI) e quatro nucleares (RAG1, RAG2, MYH6 e PTR). Os dados apoiaram a existência dos três cladogramas anteriormente relatados (A, B e C), sendo o Clado A correspondente à Stevardiinae e grupo-irmão do Clado B. Os dados de Thomaz (2015) apontaram para a existência de sete tribos em Stevardiinae: Eretmobryconini, Xenurobryconini, Glandulocaudini, Stevardiini, Hemibryconini, Creagrutini e Diapomini. Algumas espécies de *Bryconamericus* analisadas foram alocadas na tribo Eretmobryconini, como *B. brevirostris*, *B. miraensis*, *B. peruanus*, *B. dahli*, *B. emperador* e *B. scleroparius*, hoje realocadas no gênero *Eretmobrycon*, tal qual espécies de *Bryconamericus* que pertenciam ao clado Hemibryconini (*B. loisae*, *B. cristianii* e *B. caucanus*, por exemplo) atualmente pertencentes ao gênero *Hemibrycon*.

Diapomini, a terceira tribo com representantes de *Bryconamericus*, também exibiu relações filogenéticas que desencadearam a mudança de gênero para algumas espécies. Foi o caso de *Bryconamericus deuterodonoides*, *B. ortiguasae*, *B. caquetae*, *B. cinarucuense* e *B.*

alpha, que se mostraram filogeneticamente próximos às espécies de *Knodus*; *Bryconamericus pectinatus*, proximamente relacionado à *Bryconacidnus* e hoje chamado de *Bryconacidnus pectinatus*, e *Bryconamericus stramineus*, relacionada à *Piabarchus analis*, hoje válida como *Piabarchus stramineus*.

As espécies de *Bryconamericus* das bacias dos rios Paraná e Uruguai e bacias costeiras do sudeste do Brasil (*B. iheringii*, *B. patriciae*, *B. cf. iheringii*, *B. uporas*, *B. aff. uporas* e *B. rubropictus*) formaram um nó “*Bryconamericus sensu stricto*”, onde *B. exodon* é a espécie tipo. Além de contemplar as espécies congêneres citadas, este nó contém também espécies de *Hypobrycon*, *Odontostoechus* e *Nantis*, de forma que os autores sugeriram sinonimizar os três gêneros com *Bryconamericus*.

Mirande (2018) realizou a análise filogenética mais abrangente em Characidae a partir de dados morfológicos e informações moleculares. Para isto foram analisados 520 caracteres morfológicos, dos quais 98 foram novamente definidos, abrangendo a análise total de 473 espécies, dentre as quais estiveram espécies fósseis. O trabalho consolidou a monofilia da família sustentada por cinco sinapomorfias morfológicas, tendo Agoniatiidae + Gasteropelecidae, Bryconidae, Acestrorhynchidae + Iguanodectidae e Chalceidae como grupos irmãos. A base da árvore de Characidae foi formada por † *Bryconetes* e † *Paleotetra*, gêneros datados do Eoceno-Oligoceno, grupos-irmãos dos dois clados sucessivamente formados, um composto por Stethaprioninae e outro englobando Stevardiinae e as demais subfamílias. Neste clado, Spintherobolinae foi considerado grupo-irmão de um grande clado composto por Exodontinae, Characinae + Tetragonopterinae; Aphyocharacinae + Cheirodontinae, e Stevardiinae.

Quanto a Stevardiinae, Mirande (2018) corroborou a ocorrência das sete tribos proposta por Thomaz et al. (2015), com Glandulocaudini e Stevardiini como grupos-irmãos. *Bryconamericus* foi representado por pelo menos dez espécies válidas atualmente: *Bryconamericus pachacuti*, *B. mennii*, *B. exodon*, *B. agna*, *B. uporas*, *B. ikaa*, *B. iheringii* e *B. rubropictus*, *B. patriciae*, e *B. turiuba*, e permaneceu como polifilético em Diapomini, com *B. exodon* filogeneticamente relacionada a *B. stramineus*, e as demais espécies de *Bryconamericus* distribuídas entre os clados de Diapomini, a maioria das quais englobadas no Clado *Nantis* (*B. agna*, *B. uporas*, *B. ikaa*, *B. iheringii* e *B. rubropictus* + *B. cf. iheringii*) (Fig. 1).

A proximidade filogenética entre *Bryconamericus exodon* e *B. stramineus* difere do relatado por Thomaz et al. (2015) e que levou à realocação desta espécie no gênero *Piabarchus*. O trabalho de Mirande (2018) ressalta que *B. stramineus* é dificilmente

distinguível de *B. exodon* morfologicamente, e sugere resgatar “*Piabarchus*” *stramineus* de volta à *Bryconamericus*. De maneira similar, o autor rebate a sugestão de sinonimizar *Hypobrycon*, *Odontostoechus* e *Nantis* com *Bryconamericus*, feita por Thomaz et al. (2015), devido às divergências sobretudo morfológicas entre eles, e sugere “ressuscitar” estes gêneros até a realização de novos estudos em Diapomini.

A permanência de *Bryconamericus* como polifilético remete à necessidade de realização de novos estudos de taxonomia integrativa, visando contemplar análises morfológicas, citogenéticas e moleculares na resolução das problemáticas destes e de outros gêneros em Stevardiinae.

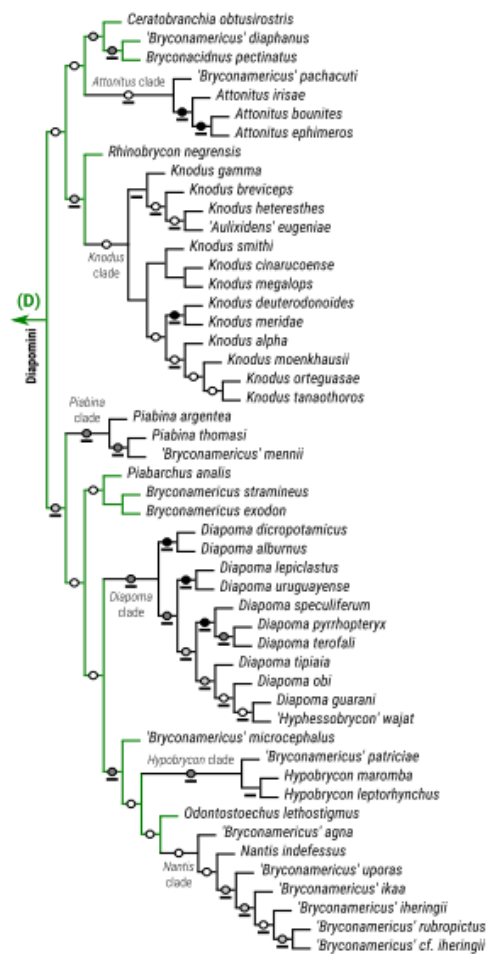


Fig. 1 Filogenia de Diapomini extraída de Mirande (2018) revelando o polifiletismo de *Bryconamericus* e a proximidade filogenética entre *B. exodon* e *B. stramineus*, bem como a concentração da maioria das espécies de *Bryconamericus* analisadas no clado *Nantis*.

2.5 Estudos citogenéticos em *Bryconamericus*

Bryconamericus é um dos gêneros mais numerosos de Characidae, com 56 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2018), porte tipicamente reduzido e com carência de dados citogenéticos e moleculares quando comparados ao número de

espécies pertencentes ao gênero. Os estudos citogenéticos em *Bryconamericus* restringem-se basicamente à região do Alto rio Paraná, na qual são encontradas três espécies: *B. exodon*, *B. iheringii* e *B. turiuba*, além de outra espécie tratada por Graça e Pavanelli (2007) como possivelmente nova para a ciência, *B. aff. iheringii*. Jerep e Shibatta (2017) descreveram esta nova espécie de *Bryconamericus* como *B. coeruleus*, a qual é encontrada nos tributários dos rios Ivaí, Piquiri e Tibagi, no estado do Paraná. Deste modo, os estudos em “*B. aff. iheringii*” destas regiões, agora deverão ser atribuídos a *Bryconamericus coeruleus*.

As primeiras análises citogenéticas em *Bryconamericus* foram realizadas por Portela, Galetti Jr. e Bertollo (1988) em uma população de *B. stramineus*¹ do rio Mogi-Guaçu, obtendo número diploide de 52 cromossomos e fórmula cariotípica composta por 26 cromossomos meta/submetacêntricos e 26 cromossomos subtelo/acrocêntricos (26m/sm + 26st/a).

As espécies de *Bryconamericus* já estudadas citogeneticamente apresentam duas características principais: o número diploide (2n) conservado de 52 cromossomos, que corrobora os dados de Characidae onde a maioria das espécies apresenta 2n=50/52 cromossomos (PISCOR, 2012); e um padrão de distribuição de heterocromatina predominante nas regiões centromérica/pericentromérica dos cromossomos, com algumas marcações terminais (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2003; PORTELA-CASTRO et al., 2008; SANTOS et al., 2012; PISCOR et al., 2013; DA SILVA; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2014; NISHIYAMA et al., 2015), podendo haver ainda blocos heterocromáticos intersticiais (SANTOS et al., 2012, citótipo IV), muitas vezes considerados marcadores populacionais. Por outro lado, a fórmula cariotípica pode apresentar grandes variações mesmo entre indivíduos de uma mesma população (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2002a; PORTELA-CASTRO et al., 2008; SANTOS et al., 2012;), assim como o número das regiões organizadoras de nucléolos identificadas através de impregnação por nitrato de prata (AgRONS), que são majoritariamente múltiplas, e podem variar em número e localização tanto intra quanto interpopulacionalmente (WASKO; GALETTI JR, 1999; CAPISTANO et al., 2008; EBEHARDT et al., 2012; SANTOS et al., 2012; DA SILVA et al., 2014;). RONS simples foram observadas por Fernandes et al. (2010) em *Bryconamericus stramineus*¹, por Santos et al. (2012) no citótipo II de *B. ecai*, e por Piscor et al., 2013 em *B. stramineus*¹, *B. turiuba* e *B. cf. iheringii*.

¹ Espécie válida atualmente como *Piabarchus stramineus*, mas o estudo recente de Mirande (2018) contesta esta classificação e sugere sua realocação em *Bryconamericus*.

As análises de citogenética molecular, caracterizadas pela hibridização *in situ* com sondas para 18S rDNA confirmam a localização das RONS (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2003; PORTELA-CASTRO; JULIO-JR, 2008 - *B. aff. iheringii* do Córrego Tatupeba; SANTOS et al., 2012; PISCOR et al., 2013 - *B. stramineus*¹ e *B. cf. iheringii*; NISHIYAMA et al., 2015), muitas vezes evidenciando sítios “extras” (PAINTNER-MARQUES; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2002b; CAPISTANO; PORTELA-CASTRO; JULIO-JR, 2008; PISCOR et al., 2013 - *B. turiuba*; DA SILVA; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2014), inativos e portanto não identificados através da impregnação por nitrato de prata (CAPISTANO, PORTELA-CASTRO; JULIO-JR, 2008).

A FISH com sondas de 5S rDNA foi realizada apenas por Piscor et al. (2013) em *Bryconamericus*, revelando sítios simples na região pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos em *B. stramineus*, e na região pericentromérica de dois pares de cromossomos acrocêntricos em *B. turiuba*, em ambos os casos representando pares cromossômicos distintos dos portadores dos cístrons de 18S rDNA. Em *Bryconamericus cf. iheringii*, os autores encontraram também cístrons simples deste gene, em sintenia aos cístrons de 18S rDNA no braço curto de um par de cromossomos acrocêntricos. A carência de dados sobre este gene ribossomal em *Bryconamericus* dificulta a realização de análises comparativas e a evidência de possíveis variações que venham a sugerir a ocorrência de eventos de pseudogenização e inserção de elementos transponíveis em sequências potencialmente funcionais deste gene, já relatadas para outros teleósteos (ver PINHAL et al., 2011 e GLUGOSKI et al., 2018).

2.6 Famílias Multigênicas

2.6.1 Origem e caracterização das famílias multigênicas

Nos organismos multicelulares, cerca de 25 a 50% dos genes capazes de codificar proteínas são conhecidos como genes de cópia única, por estarem presentes uma única vez no genoma, enquanto os demais são alocados em famílias que reúnem pelo menos dois genes similares: as **famílias multigênicas** (USP, 2018).

Uma família multigênica pode ser definida como um conjunto de genes que derivaram de um único gene ancestral (NEI; ROONEY, 2005) através de eventos de duplicação total de um gene, ou de duplicação parcial, que compreende a duplicação e embaralhamento de exons de genes diferentes seguida por derivação, de forma que os genes de uma mesma família apresentam diversos graus de similaridade entre si, tanto em sua estrutura quanto em sua função (WALSH; STEPHAN, 2001). Os genes que codificam para

mioglobina e a hemoglobina em mamíferos, por exemplo, são descendentes de um único ancestral comum: essa é a duplicação; mas a mioglobina está envolvida no metabolismo de oxigênio no músculo, enquanto a hemoglobina está envolvida no transporte de oxigênio no sangue: essa é a divergência (HOLSINGER, 2017).

As cópias dos genes pertencentes às famílias multigênicas sofrem mutações ao longo do tempo, onde algumas podem ser selecionadas, favorecendo uma cópia gênica em detrimento de outras, enquanto outras cópias podem ser inativadas pelo acúmulo de mutações, deixando de codificar produtos gênicos funcionais (USP, 2018). Estas sequências alteradas por deleções de bases ou mutações sem sentido, por exemplo, são chamadas de pseudogenes, e receberão maior destaque a seguir (WALSH; STEPHAN, 2001; NEI; ROONEY, 2005; REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013).

Walsh e Stephan (2001) atentam para o fato de que as famílias multigênicas também estabelecem relações evolutivas entre si, de acordo com a sua ancestralidade comum, ainda que esta seja remota; e que elas variam tanto quanto ao número de genes que abrigam, quanto pela sua organização genômica, pois seus genes podem estar dispersos isoladamente no genoma, ou em vários graus de agrupamentos gênicos, podendo chegar ao nível de agrupamento extremo onde toda a família arranja-se *em tandem* em um mesmo ponto do genoma. Genes que codificam os RNAs ribossômicos, por exemplo, concentram-se em muitas cópias *em tandem* situadas em um ou mais locais nos cromossomos. Estes locais são chamados de regiões organizadoras de nucléolos, e podem ser evidenciados em microscopia tanto por coloração com nitrato de prata (HOWELL; BLACK, 1980) quanto por hibridização *in situ* com o uso de sondas específicas para os rDNAs (ver PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986, USP, 2018).

Entretanto, os multigenes não correspondem apenas a genes codificantes ou estruturais como é o caso dos genes de rDNA, mas também a outras sequências repetitivas encontradas no genoma. Cita-se:

a) DNA-satélites

Os DNA-satélites formam uma classe distinta de DNA repetitivo, e apesar de numerosos estudos, o significado funcional destes DNAs ainda é pouco compreendido (RICH; OGRYZKO; PIROZHKOVA, 2014). Sabe-se que as famílias de DNA satélites são organizadas em grandes conjuntos de sequências curtas não codificantes altamente repetitivas (milhares a milhões de repetições *em tandem*) (GARRIDO-RAMOS, 2017), que diferem do restante do material genético pela sua composição de bases (USP, 2018). Estas famílias se acumulam na heterocromatina em diferentes partes dos cromossomos eucarióticos,

principalmente nas regiões pericentromérica e subtelomérica, podendo abranger também o centrômero funcional e regiões intersticiais, quando do espalhamento de *loci* subtelomérico para intersticial (GARRIDO-RAMOS, 2015).

De acordo com Garrido-Ramos (2017), os DNA satélites podem apresentar diversos arranjos nos diferentes genomas, sendo que mais de uma família pode estar presente numa mesma espécie, embora geralmente uma sempre ocorre em maior quantidade do que as demais. É o caso, por exemplo, da família α , que compreende mais da metade de todo o de DNA satélite presente no genoma humano (LANDER et al., 2011; LEVY et al., 2007). Neste genoma, os DNA-satélites representam 10-15% das sequências repetitivas encontradas (TURNPENNY; ELLARD, 2012 *apud* RICH; OGRYZKO; PIROZHKOVA, 2014), e são um dos principais componentes da heterocromatina.

Existem dois tipos de DNA-satélites além das sequências de longas repetições (sequências satélites), e que diferem entre si pelo número de cópias que apresentam: os **microssatélites** (SSRs), apresentam em sua maioria 1 a 6 nucleotídeos repetidos em série e encontram-se distribuídos ao longo do genoma de eucariotos e procariotos (FIELD; WILLS, 1998), sendo associados a diversas doenças em humanos (RAMEL, 1997; OLIVEIRA et al., 2006); e os **minissatélites**, caracterizados pela presença de 6 a 100 pares de base (a maioria com 9 a 30 pares de base) (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985 *apud* RAMEL, 1997) localizados em diferentes regiões de diferentes cromossomos em diferentes indivíduos. Desta forma, o uso de enzimas de restrição e uma sonda correspondente a um minissatélite acarretam na formação de fragmentos de tamanhos diferentes em diferentes indivíduos, e se a hibridização ocorrer em mais de um minissatélite, resulta na formação de um *fingerprinting* de DNA, motivo pelo qual estas sequências são utilizadas nos testes de paternidade (USP, 2018).

Apesar de terem sido inicialmente considerados como “DNA lixo” ou como “segmentos egoístas” de DNA, por compreender repetições não-codificantes associadas à heterocromatina (GARRIDO-RAMOS, 2015), atualmente existe o reconhecimento da importância destas sequências sobre diversos eventos celulares, dentre os quais a regulação da expressão gênica (GARRIDO-RAMOS, 2015; PEZER et al., 2012). Além disso, alguns autores sugerem a atuação destas regiões na organização dos cromossomos, seu pareamento e segregação durante a divisão celular (PLHOL et al., 2008), e a ação de seus transcritos na montagem do cinetócoro, na regulação epigenética do estabelecimento e manutenção da heterocromatina, atuando ainda num programa geral de resposta ao estresse ativado por estímulos ambientais (PEZER et al., 2012).

b) Elementos Genéticos Móveis (Transposons de DNA e Retrotransposons)

Os elementos genéticos móveis, ou elementos transponíveis (ETs), foram primeiramente identificados pela geneticista norte-americana Barbara McClintock num estudo pioneiro executado entre 1929 e 1935, através da análise de dois *locus* gênicos (*Ds* e *Ac*) responsáveis pela coloração mosaico em pericarpos de milho (*Zea mays* ssp. *mays*), desvendando um mecanismo de movimentação e dinâmica cromossômica que foi posteriormente atribuída a estes elementos (VARANI et al. 2015).

Os elementos transponíveis são chamados de segmentos “egoístas” de DNA, pois codificam proteínas que os permitem copiar ou mover a si mesmos através do genoma (CHANDRASEKARAN; BETRÁN, 2008). Existem dois tipos de ETs: os *transposons* de DNA e os *retrotransposons* (CHANDRASEKARAN; BETRÁN, 2008; CORDAUX; BATZER, 2009; SNUSTAD; SIMMONS, 2013). No caso dos transposons de DNA (ou elementos do tipo II), a clivagem se dá pela ação enzimática de *transposases*, enzimas em geral codificadas pela própria sequência de DNA, que reconhecem as repetições terminais invertidas (TIRs) que flanqueiam o ET, retiram o ET da posição doadora e, então, o integram no novo local receptor (Fig. 2A). A folga que é deixada na posição doadora pode então ser reparada sem substituição do elemento (transposição “corta-e-cola”) ou preenchida com uma cópia do transposon por reparo do *gap*. Os elementos transponíveis do tipo II são reconhecidos como autônomos, pois conseguem realizar todo o processo sozinhos. Entretanto, estes transposons podem sofrer mutações que ocasionem a perda desta autonomia, por afetar diretamente a síntese das suas transposases. Neste caso, o ET corresponderá apenas às TIRs, conectadas entre si numa orientação cauda-a-cauda, e são chamados de MITES (elementos transponíveis de repetição invertida em miniatura), que compreendem grande parte dos ETs presentes no genoma de eucariotos (Fig. 2B) (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007).

Os retrotransposons, por sua vez, são originados a partir da transcrição reversa de uma sequência de RNA em DNA, sendo esta sequência de desoxirribonucleotídeos inserida em pontos aleatórios do genoma (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007; SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Segundo Slotkin e Martienssen (2007), estes elementos transponíveis que requerem mais de uma etapa para sua inserção, são também chamados de ETs do tipo I, e são divididos em dois tipos com base na presença ou ausência de repetições diretas nas suas extremidades, as repetições terminais longas (LTRs). Os retrotransposons com LTR são formados por uma região codificadora central que é flanqueada pelas repetições terminais longas (LTR) de mesmo sentido, enquanto os retrotransposons sem LTR, ou retroposons, são caracterizados pela presença de uma sequência homogênea de pares de base A-T em uma das

extremidades, resultante da transcrição reversa da cauda poli-A do seu RNA (Fig. 2D) (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Dentre os retroposons, encontram-se pseudogenes, elementos nucleares intercalares longos (LINEs) e elementos nucleares intercalados curtos (SINEs), com 100 a 500 pb (KAPITONOV; JURKA, 2003).

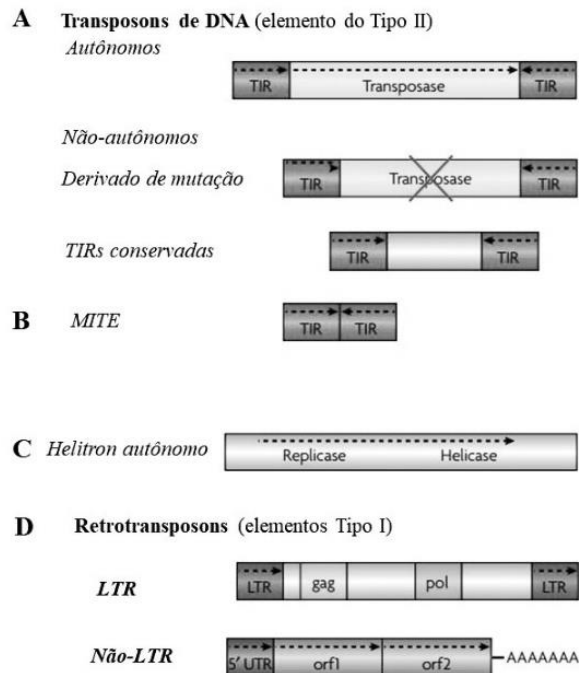


Fig. 2 Representação esquemática dos elementos transponíveis. A: Transposons de DNA (Tipo II), autônomos (codificação de transposases) e não autônomos (derivados de mutação); B: elementos transponíveis de repetição invertida em miniatura; C: Transposons autônomos com replicação por círculo rolante; D: Retrotransposons LTR e Não-LTR. Modificado de Slotkin e Martienssen (2007).

Cabe ressaltar que nem todos os elementos transponíveis replicam-se através dos mesmos mecanismos. É o caso dos Helitrons autônomos e sua replicação por círculo rolante, onde a própria molécula apresenta uma helicase de DNA e uma replicase (Fig. 2C) similar à proteína Replicon-A (RPA) (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007).

Devido à sua mobilidade, os elementos transponíveis podem causar uma série de mudanças no genoma, as quais vão desde a variação da sequência local até rearranjos genômicos de grande escala, que resultam em alta divergência nos tamanhos e organizações dos genomas mesmo entre espécies intimamente relacionadas (CORDAUX; BATZER, 2009). Isso promove a origem de novos elementos de regulação gênica, como locais de início e término de transcrição, locais de sinalização para *splicing*, sinais de poliadenilação, entre outros, modificando a expressão gênica e as redes regulatórias genéticas (COWLEY; OAKEY, 2013).

c) Pseudogenes

O termo “pseudogenes” teve sua origem a partir dos trabalhos de Jacq e os demais membros de sua equipe em 1977, após a descoberta de uma sequência de DNA truncada, mas ainda homóloga em relação aos genes de 5S rDNA de *Xenopus laevis*. A partir daí os pseudogenes foram progressivamente sendo descobertos nos mais diversos grupos de animais e vegetais, graças ao advento das técnicas de sequenciamento genético (PINK et al., 2011). Acredita-se que os pseudogenes sejam derivados de genes parentais funcionais que sofreram alterações em suas sequências devido a mutações ou outras anormalidades capazes de acarretar a produção de cópias gênicas não codificantes ou com produtos gênicos não funcionais, o que inclui, por exemplo, a perda do códon de início, a presença de códons de término adicionais e a ausência ou anormalidade das suas sequências regulatórias (GIBSON, 1994; ANAND, 2011; USP, 2018).

Existem dois tipos principais de pseudogenes, diferenciados entre si pela distância em que estão localizados em relação às cópias funcionais do gene em questão, e pela sua origem. O pseudogene que se mantém próximo aos genes funcionais é chamado de **pseudogene não processado** (Fig. 3), pois sua origem teria se dado a partir de duplicação gênica simples ou do *crossing-over* desigual, originando um cromossomo no qual o gene funcional foi perdido - o que levará à sua eliminação por seleção natural, - e outro com duas cópias gênicas, que pode vir a sofrer mutações em uma das cópias sem que isso seja prejudicial ao organismo (USP, 2018). Estes pseudogenes possuem introns e regiões regulatórias tal qual o gene funcional, mas sua expressão é impedida pela presença de códons de término, de forma que, se produzido, seu RNA não será funcional (GIBSON, 1994; PINK et al., 2011).

O pseudogene encontrado distante do gene funcional é classificado como **pseudogene processado** (Fig. 3), pois parece ser uma cópia alterada dos genes ativos: não possui introns e nem promotor para a enzima polimerase II (ou III), ou seja, não é mais transcrito a menos que utilize a região promotora de genes próximos; mas são dotados de cauda poli-A, o que evidencia sua origem a partir do mRNA do gene transcrito. Os pseudogenes processados são encontrados em diferentes cromossomos, geralmente flanqueados por “repetições diretas”, relacionadas aos elementos genéticos móveis que podem desempenhar um importante papel na inserção de um pseudogene no genoma, pois acredita-se que a transcriptase reversa necessária para a construção de uma molécula de DNA a partir do mRNA do gene ativo advenha destes ETs (GIBSON, 1994; KANEKO et al., 2006; USP, 2018).

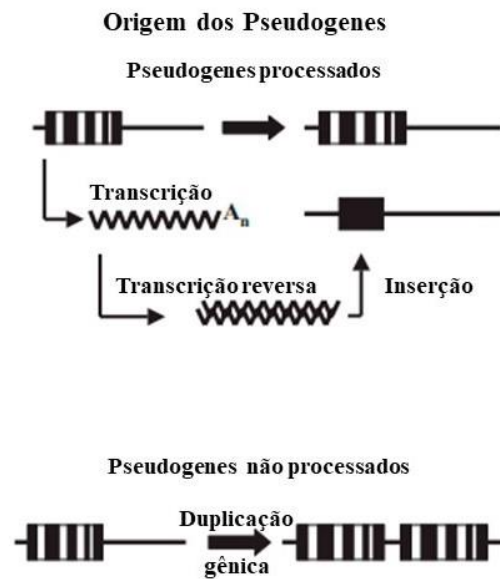


Fig. 3 Origem e características dos pseudogenes. Os éxons correspondem aos blocos em preto, intercalados por blocos em branco, os introns. As linhas em zigue-zague compreendem ao mRNA e ao cDNA oriundos da transcrição reversa, respectivamente (Modificado de D’Errico; Gadaleta; Saccone, 2004).

É importante constatar que alguns pseudogenes exibem transcrição específica em determinados tecidos, e sua taxa de transcrição pode até ser maior do que a do próprio gene funcional, enquanto outros têm expressão aumentada durante momentos de estresse. Se considerarmos que esta dinâmica vem sendo mantida há milhares de anos, tudo indica que seus transcritos apresentam alguma importante função celular, de forma que os pseudogenes não podem ser tratados como “DNA lixo” (PINK et al., 2011).

As possíveis funções dos pseudogenes ainda envolvem muitas discussões. Balakirev e Ayala (2003) sugeriram que os pseudogenes são peças-chave na variabilidade genética, promovendo a diversificação de anticorpos e a variação antigênica, ambas geradas por processos de conversão gênica, tanto entre genes ativos quanto entre genes ativos e pseudogenes, seguidas de diversificação. Entretanto, a função mais discutida é a de regulação dos processos celulares, dentre as quais a regulação do próprio gene parental (PINK et al., 2011). Em humanos, existem vários genes associados à progressão do câncer que apresentam pseudogenes capazes de atuar na fisiopatologia dos tumores. Piehler et al. (2008), por exemplo, ao analisarem as proteínas transmembranas ABC dependentes de ATP, cuja desregulação está associada à resistência a drogas em tumores, verificaram que a proteína ABCC6, membro desta família, apresenta um promotor bem conservado e compartilha com o pseudogene ABCC6P1 um padrão semelhante de expressão, de forma que seus níveis de mRNA são reduzidos quando os níveis de transcrição do pseudogene são também reduzidos.

Outra função resultante da associação entre genes e seus pseudogenes é o emparelhamento anti-sentido dos dois mRNAs, formando RNAs de dupla fita (dsRNA) quando o pseudogene se insere no sentido contrário ao do gene, o que resulta na formação de pequenos RNAs de interferência (siRNA). Além desta, controlar a estabilidade dos mRNAs dos genes ativos também parece ser uma função dos pseudogenes, pois, considerando sua forte homologia com os genes parentais, a expressão dos pseudogenes numa taxa maior do que a observada para estes genes poderia estabelecer um cenário de competição por moléculas estabilizadoras dos seus mRNAs (cis e trans), o que favoreceria a estabilidade do mRNA do gene mais expresso, no caso o pseudogene (PINK; CARTER, 2013).

2.6.2 Famílias multigênicas: DNAs ribossomais (rDNAs)

Em eucariotos, os genes de DNAs ribossomais (rDNAs) compreendem duas famílias multigênicas diferentes (MARTINS; WASKO, 2004; REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013), geralmente organizadas em grupos de centenas a milhares de cópias idênticas ou muito similares (MAEDA et al., 2018). A primeira engloba os genes de 45S rDNA, que codificam os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 26-28S, enquanto a segunda contempla os genes de 5S rDNA que codificam os pequenos RNAs ribossomais 5S (MARTINS; WASKO, 2004).

As duas famílias multigênicas de DNAs ribossomais geralmente não estão ligadas em eucariotos, e, em termos citogenéticos, cada qual situa-se num par cromossômico específico (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013), embora diversos estudos em peixes, por exemplo, tenham evidenciado a ocorrência de múltiplos *loci* e mesmo a co-localização destes genes ribossomais (ver MANTOVANI; ABEL; MOREIRA-FILHO, 2005; PISCOR et al., 2013). Outra peculiaridade foi encontrada por Maeda et al. (2018) no fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus irregularis*, que apresentou evidências da ocorrência de apenas 10 a 11 cópias completas da família multigênica 45S rDNA, as quais são ainda bastantes heterogêneas e não assumem a organização em *tandem*, como visto na maioria dos eucariotos.

Os genes ribossomais situam-se no nucléolo, região bastante proeminente no núcleo interfásico, onde são transcritos, processados e utilizados na montagem dos ribossomos (COOPER, 2000). Os 5.8S, 18S e 28S rRNAs são transcritos como uma única unidade dentro do nucléolo pela RNA polimerase I, produzindo o RNA ribossômico precursor 45S. O pré-rRNA 45S é então processado para a remoção dos espaçadores transcritos externos (ETSs) e dos dois espaçadores transcritos internos (ITSs), os quais, junto com o rDNA 5.8S costumam ser chamados de ‘região ITS’ (ITS 1 + 5.8S + ITS 2) (SCHOCH et al., 2012). O

processamento origina o 18S rRNA da subunidade ribossômica menor (40S), e os 5,8S e 28S rRNAs da subunidade ribossômica maior (60S) (Figs. 4 e 5) (COOPER, 2000).

As regiões ITS geralmente apresentam rápidas taxas de divergência evolutiva (SCHLÖTTERER et al., 1994) e têm se mostrado cada vez mais relevantes em estudos de filogenia molecular, pois assim como os genes mitocondriais citocromo C Oxidase 1 (COI), possuem alta variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica, podendo serem utilizadas como *barcoding* para alguns grupos, como relata o trabalho de Schoch et al. (2012) em fungos.

Os rRNAs compõem as subunidades dos ribossomos através da sua associação a proteínas ribossômicas: a subunidade 60S contém uma cópia de cada um dos rRNAs (28S, 5.8S e 5S) associada a cerca de 49 proteínas ribossômicas, enquanto a subunidade 40S é formada pela associação de uma cópia de 18S rRNA com 33 proteínas ribossômicas (MARTINS; WASKO, 2004). Segundo Cooper (2000) esta associação inicia antes mesmo do processamento do pré-rRNA, e a medida que estas moléculas amadurecem, as proteínas restantes se associam a elas. O tempo de maturação decorre do tamanho das moléculas, logo a subunidade menor (18S rRNA), amadurece mais rápido do que a subunidade maior (28S, 5.8S e 5S rRNAs). Ao final deste processo, as partículas pré-ribossômicas são exportadas para o citoplasma, formando as subunidades ativas 40S e 60S dos ribossomos eucarióticos (Fig. 5).

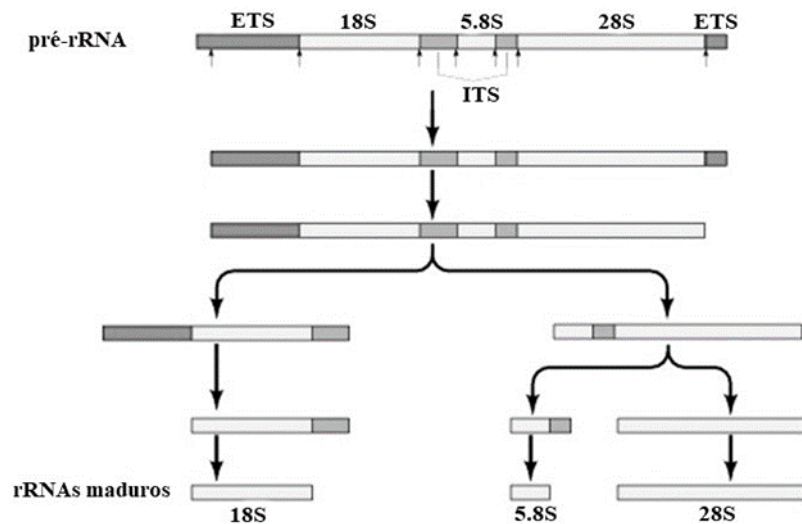


Fig. 4 Processamento e maturação do pré-rRNA 45S, resultando na formação dos rRNAs 18S, 5.8S e 28S. Modificado de Cooper (2000).

A transcrição do 5S rRNA, também constituinte da subunidade ribossômica 60S, ocorre fora do nucléolo e é catalisada pela RNA polimerase III (COOPER, 2000) (Fig. 5). Segundo Mantovani, Abel e Moreira-Filho (2005), os sítios ativos dos genes de 45S rDNA

são coincidentes com as RONS nos cromossomos, o que não é observado para os genes que codificam o pequeno 5S rDNA, que, como já citado, são transcritos fora do nucléolo.

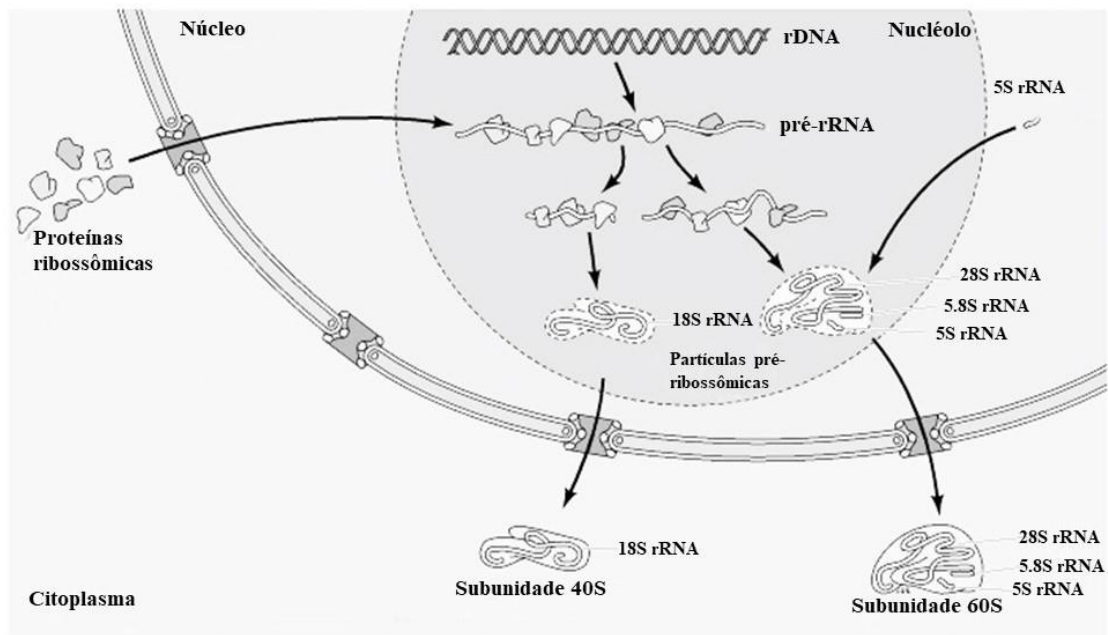


Fig. 5 Associação das proteínas ribossômicas aos rRNAs no nucléolo, formando as subunidades ribossômicas maior (60S) e menor (40S), compostas pelos rRNAs 28S+5.8S+5S, e 18S, respectivamente. Após a maturação, as partículas pré-ribossômicas são transportadas para o citoplasma, onde as subunidades tornam-se ativas. Extraído de Cooper (2000).

Os genes de 5S rDNA possuem estrutura diferenciada dos demais genes ribossômicos, pois exibem uma sequência codificante altamente conservada de aproximadamente 120 pares de base, separadas entre si por espaçadores não transcritos (sequências NTS) (Fig. 6). De acordo com Williams e Strobeck (1985), apesar do gene que codifica o 5S rRNA ser conservado até mesmo entre taxons não relacionados, seu NTS varia muito quanto ao número de pares de base, de forma que esta sequência é responsável pelo grande dinamismo das repetições em *tandem* do 5S rDNA. Sequências de DNA não transcritas, como os NTSs, podem conter elementos conservados entre seus pares de bases, e estes podem assumir importantes funções na regulação da expressão destes genes (MARTINS; WASKO, 2004).

Os genes de 5S rDNA apresentam ainda outras particularidades que os distinguem grandemente dos demais genes ribossômicos, dentre os quais a presença de três regiões de controle de transcrição situadas à jusante do ponto de início da síntese do RNA. Estas regiões compreendem a um Box A, responsável pela ligação da RNA polimerase III, um Elemento Intermediário e um Box C, específicos destes genes ribossômicos e considerados os principais responsáveis pela ligação estável do fator de transcrição TFIIIA (PIELER et al., 1987), que

inicia a formação do complexo de início da transcrição, processo que culmina com o recrutamento da RNA polimerase III (VELDHOEN et al. 1994, MALE et al. 2015).

Montante às regiões de controle interno, o espaçador não transcrito também apresenta regiões características e necessárias para a síntese do 5S rRNA funcional: uma Citosina imediatamente anterior ao ponto de início da transcrição (C -1), um elemento rico em Guanina + Citosina (Box GC), e um elemento rico em A + T (*TATA-like*), que se assemelham a elementos regulatórios identificados também em outros tipos de genes (VENKATESWARLU; LEE; NAZAR, 1991).

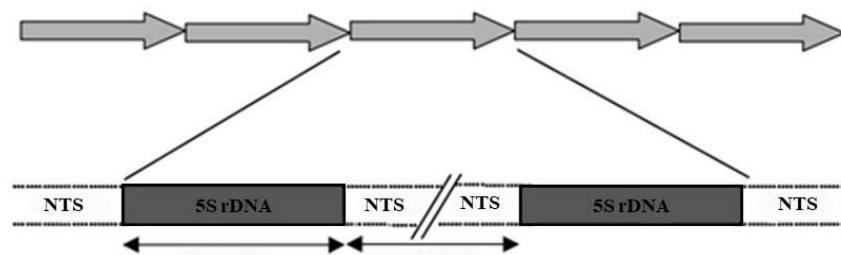


Fig. 6 Arranjo dos genes de 5S rDNA na maioria dos eucariotos, intercalados com sequências de DNA não transcritas (NTS). Modificado de Martins e Wasko (2004).

Por não serem transcritos no nucléolo, os 5S rRNAs são os únicos dentre os RNAs ribossômicos a formarem uma partícula pré-ribossômica com a proteína L5 em eucariotos, evento possivelmente relacionado ao transporte destes RNAs para o nucléolo durante a montagem dos ribossomos (CIGANDA; WILLIAMS, 2011). Nestas organelas, o 5S rRNA estabelece a ligação entre as subunidades ribossômicas menor (40S) e maior (60S), fazendo parte da região chamada de ‘protuberância central’ (PC) (SPAHN et al., 2001). Smith et al. (2001) verificaram, a partir de um estudo em *Saccharomyces cerevisiae*, que estes pequenos RNAs apresentam regiões específicas, possivelmente envolvidas em funções específicas do ribossomo, e que estão localizadas em importantes pontos de interação física entre o 5S rRNA e os diferentes centros funcionais da organela, e propuseram, a partir disso, que uma das principais funções deste RNA ribossômico pode ser aumentar a fidelidade da tradução através de sua atuação como um transdutor físico de informação entre todos os diferentes centros funcionais do ribossomo.

2.6.3 Evolução das famílias multigênicas

O estudo dos processos que levam à evolução das famílias de multigenes, requer a abordagem dos dois tipos de comparações que podem ser feitas entre famílias de genes de

diferentes espécies: as comparações ortólogas, que envolvem o mesmo *locus* gênico, e cuja diferenciação decorre dos eventos de especiação; e as comparações parálogas, que envolvem genes de *locus* diferentes, cuja divergência ocorreu após a duplicação de um gene ancestral. Por exemplo, os *loci* da β -globina de humanos e galinhas são ortólogos, enquanto os *loci* de α e β -globina (dois *loci* diferentes) de qualquer par de táxons são parálogos (WALSH; STEPHAN, 2001; HOLSINGER, 2017).

Ao partirmos da ideia de que as famílias multigênicas originam-se através de processos de duplicação gênica seguidos por eventos de diversificação (WALSH; STEPHAN, 2001; HOLSINGER, 2017), temos que muitos dos grupos que apresentam similaridades em determinados *loci* divergiram entre si muito antes do que os seus genes na sua história evolutiva, ou seja, até o momento em que um gene se torna duplicado, sua história evolutiva coincide com a história evolutiva dos organismos que o contêm, mas após a duplicação, cada cópia gênica segue uma história evolutiva independente, traçando a sua própria história de especiação e divergência. Deste modo, durante longos períodos de tempo, as cópias duplicadas do mesmo gene compartilham ancestralidade mais recente com cópias do mesmo gene em uma espécie diferente, do que com genes duplicados no mesmo genoma (HOLSINGER, 2017).

2.6.3.1 Mecanismos de evolução das famílias multigênicas: Evolução Concertada

A Evolução Concertada é um dos principais mecanismos utilizados para explicar o processo de evolução das famílias multigênicas que exibem alta similaridade entre si, mantida ao longo do tempo. Um exemplo foi dado por Brown, Wensink e Jordan (1972) ao compararem os genes de RNAs ribossomais de duas espécies do gênero *Xenopus* (*X. laevis* e *X. mulleri*). Os autores evidenciaram grandes divergências na composição nucleotídica entre os rRNAs das duas espécies estudadas (*locus* ortólogos), embora dentro de cada uma das espécies houvesse pouca ou nenhuma variação detectável.

Como já visto, os RNAs ribossômicos são codificados em um arranjo de longa distância, com os genes adjacentes separados entre si por regiões intergênicas (IGS), em geral bastantes semelhantes dentro das espécies e diferentes para espécies distintas, enquanto os genes de rRNA em si mostram-se relativamente conservados mesmo entre espécies. Esta variação nos espaçadores intergênicos (IGS) reflete a ocorrência de mutações distintas fixadas de maneira independente em cada espécie (WALSH; STEPHAN, 2001), como evidenciado entre *Xenopus laevis* e *Xenopus mulleri* (BROWN; WENSINK; JORDAN, 1972). Este processo não poderia ser explicado pelos mecanismos de evolução convencional (Evolução

Divergente), pois neste caso cada cópia duplicada evoluiria de maneira independente, divergindo ao longo do tempo, de forma que também seria possível observar variação intraespecífica. No entanto, a hipótese da Evolução Concertada satisfaz tal circunstância (NEI; ROONEY, 2005; GANLEY; KOBAYASHI, 2007; HOLSINGER, 2017).

Apesar de ser um modo ‘não usual’ de evolução, a Evolução Concertada (ou combinada) ocasiona a homogeneização de diferentes cópias gênicas originadas a partir de uma mesma cópia ancestral em uma mesma espécie. Existem dois mecanismos bastante relatados na literatura, e que seriam capazes de promover a Evolução Concertada: os eventos de *Crossing-over* desigual e a conversão gênica (WALSH; STEPHAN, 2001; HOLSINGER, 2017), ambos decorrentes de desalinhamentos durante a prófase meiótica. São esses desalinhamentos que permitem que a ocorrência de uma mutação em uma cópia de um gene da família, se "espalhe" para outras cópias do conjunto de genes (HOLSINGER, 2017).

A explicação para a homogeneização dos genes de rRNA de *Xenopus* está na evolução de todos os genes das famílias multigênicas como um único *locus*, através da ocorrência de múltiplos ciclos de *crossing-over* desigual (BROWN; WENSINK; JORDAN, 1972). Walsh e Stephan (2001) exemplificam este processo através da proposição de membros hipotéticos para uma ‘família multigênica’ organizada em *tandem*, chamados de “1–2–3–4–5–6”. O primeiro evento de *crossing-over* desigual acarretaria na formação de uma matriz gênica hipotética “1–2–3–3–4–5–6”, a qual seria ainda modificada em ciclos adicionais, originando, por exemplo, a matriz “1–3–3–3–3–6”. Desta maneira, os seis genes hipotéticos que se tinha originalmente, estariam agora reduzidos a apenas três (gene 1, gene 3 e gene 6), ou seja, encontram-se em processo de homogeneização.

A homogeneização, no caso das famílias de multigenes que não estão organizadas em *tandem*, ainda que não ocorra por *crossing-over* desigual, pode estar relacionada a eventos de conversão gênica (WALSH; STEPHAN, 2001). Este processo compreende a troca não recíproca entre sequências semelhantes de DNA, onde a sequência recebida pelo ‘gene receptor’ é originada a partir da cópia da respectiva sequência de um ‘gene doador’ (WALSH; STEPHAN, 2001; NEI; ROONEY, 2005) que não é necessariamente o seu homólogo, mas possui similaridade suficiente para atuar como molde na re-síntese da sequência alvo nos casos em que ocorre uma quebra na dupla fita de DNA. Deste modo, a sequência do sítio original que precisa ser reparado, é substituída pelo ‘molde invasor’, ou seja, é “convertida” na sequência do outro gene, tornando-se exatamente igual a ela (HARTL; CLARK, 2010).

2.6.3.2 Mecanismos de evolução das famílias multigênicas: Evolução por Nascimento-Morte

Nas últimas décadas alguns pesquisadores têm se dedicado extensivamente ao estudo de mecanismos que promovam a evolução das famílias multigênicas. Neste contexto, percebeu-se que nem todas as famílias evoluem em concerto, pois em alguns casos os genes não tendem à homogeneização. Atribuiu-se a elas, então, a hipótese de evolução através de um mecanismo conhecido como “Nascimento e Morte”, cujo nome advém da sequência de eventos que estão envolvidos no processo evolutivo: a origem de novos genes por eventos sucessivos de duplicação, os quais podem ser mantidos a longo prazo no genoma, ou perdidos por deleção ou através da sua degeneração em pseudogenes (HUGHES; NEI, 1992; NEI; GU; SITNIKOVA, 1997; NEI; ROONEY, 2005; REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013; BENTON, 2015).

O modelo de evolução por Nascimento-Morte foi utilizado pela primeira vez por Hughes e Nei (1989) para explicar a evolução dos multigenes que compõem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em mamíferos (NEI; ROONEY, 2005). Posteriormente outros autores desenvolveram trabalhos na mesma linha de pesquisa, reafirmando o modelo de Nascimento-Morte para os multigenes do MHC (HUGHES; NEI, 1992; NEI; GU; SITNIKOVA, 1997).

Apesar de sua estrutura gênica dividida no genoma, os genes MHCs formam uma família multigênica (OHTA, 1989) e podem ser divididos em duas classes (classe I e classe II) de acordo com a estrutura molecular e a função dos polipeptídeos codificados (NEI; ROONEY, 2005). A classe I é subdividida em dois grupos, que correspondem aos genes ‘clássicos’ (Tipo Ia) altamente polimórficos; e aos não-clássicos (Tipo Ib), que comparativamente são menos polimórficos. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) possui a função de reconhecer os peptídeos estranhos ao organismo, e apresentá-los aos linfócitos T (GOLDBERG; RIZZO, 2015). Neste contexto, a presença de diversos *loci* polimórficos é fundamental para que a célula seja capaz de reconhecer os mais variados tipos de antígenos (vírus, bactérias, protozoários, etc.), sejam eles patogênicos ou não, de forma que a resposta imune venha a ser desencadeada quando necessário (GOLDBERG; RIZZO, 2015; NEI; ROONEI, 2005).

Os polimorfismos presentes na família do MHC atentaram para o fato de que a Evolução Concertada poderia não estar guiando a evolução desta família multigênica, ainda que alguns autores tentassem justificá-la através de mecanismos de conversão gênica. Ohta (1989), por exemplo, utilizou a hipótese da transferência de domínios (exons) entre genes para explicar o polimorfismo dos *loci* Ia, baseando-se na ideia de que partes de uma determinada

sequência em um *locus* monomórfico poderiam ser convertidas a partir de uma sequência de outro *locus*, de modo que a primeira sequência seria diferente das demais. Nei e Rooney (2005) atentam para as falhas desta proposição, partindo da ausência da explicação dos motivos pelos quais a conversão gênica ocorreria entre *locus* previamente tão diferenciados em tempos evolutivos. Outro ponto ressaltado é a co-ocorrência dos genes Ia e Ib no mesmo cromossomo, de forma que se a conversão gênica fosse de fato a geradora dos polimorfismos, ambos os *loci* deveriam apresentar-se igualmente polimórficos e não mostrariam grupos monofiléticos para cada *loci*, como evidenciado em análises filogenéticas. Desta forma, aliado a outros trabalhos que demonstraram serem fracas as evidências de conversão gênica, passou-se a aceitar o mecanismo de Nascimento e Morte como o responsável por guiar a evolução tanto dos genes do MHC quanto de outras famílias multigênicas.

De modo geral, a maneira mais comum de determinar se a evolução de determinada família multigênica está sendo guiada pelo Nascimento e Morte e não pela Evolução Concertada é a presença, no genoma, tanto de um padrão de agrupamento de genes interespecífico quanto de pseudogenes, embora em muitos casos essas condições levem a concepções equivocadas, quando, por exemplo, as duplicações gênicas são recentes e/ou estão sob forte pressão purificadora, ou devido a altas taxas de *turnover* (nascimento-morte) de alguns genes. Desta forma, se as duplicações gênicas forem recentes, podem não acumular substituições nucleotídicas suficientes a ponto de serem detectáveis naquele momento; e, de maneira complementar, casos de genes sujeitos a uma forte seleção purificadora podem ou não ter seu processo evolutivo alavancado, de acordo com a expressividade do *locus* em questão (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012).

A forte seleção purificadora é a principal responsável por promover a homogeneização observada em algumas proteínas cujos genes codificadores evoluem através do Nascimento e Morte (NEI; ROGOZIN; PIONTKIVSKA, 2000). Por outro lado, a análise da evolução de multigenes que não codificam proteínas - como os RNAs ribossômicos, por exemplo - exige maiores critérios, dentre os quais o estudo da substituição de nucleotídeos nas regiões intrônicas e nos espaçadores intergênicos, quando for o caso, seguido pela comparação com a sequência codificante do gene analisado (ROONEY, 2004). Do mesmo modo, a análise da evolução de multigenes que apresentam altas taxas de *turnover* deve ser mais criteriosa, pois a deleção e a duplicação são tão frequentes que os pares de genes ortólogos são rapidamente perdidos entre as espécies, predominando um padrão de agregação dentro das espécies (ROONEY, 2004; VIEIRA; ROZAS, 2011) embora alguma substituição

nucleotídica deva permanecer, indicando a evolução por Nascimento e Morte (EIRÍN-LOPEZ et al., 2012).

Uma análise comparativa do genoma usando o conjunto completo de genes em uma estrutura filogenética é capaz de fornecer evidências mais conclusivas sobre a origem da família gênica e o seu respectivo destino evolutivo (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012). Ao tratarmos de genes codificadores de proteínas, a análise de sítios sinônimos *versus* sítios não sinônimos é capaz de revelar qual dos mecanismos evolutivos estão envolvidos no processo (ROONEY, 2004), pois, em geral, se as diferenças intraespecíficas forem quase tão altas quanto as interespecíficas, sugere-se que a evolução por Nascimento e Morte é predominante; mas, se as diferenças intraespecíficas forem menores do que as interespecíficas, observa-se o processo de homogeneização possivelmente favorecida pela Evolução Concertada (PIONTKIVSKA; ROONEY; NEI, 2002).

Desde Hughes e Nei (1989) o mecanismo de evolução por Nascimento e Morte vem sendo definido por vários autores como a fonte evolutiva de muitas famílias multigênicas além do MHC, como é o caso das famílias de histonas H1 (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2004; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2005; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012; PONTE et al., 2017) H2A (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012), H3 (ROONEY; PIONTKIVSKA; NEI, 2002; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012; WATERBORG, 2012) e H4 (PIONTKIVSKA; ROONEY; NEI, 2002), quando sob uma forte seleção purificadora que age a nível de proteína para manter a estrutura quaternária funcional da partícula central dos nucleossomos (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012); dos genes quimiossensoriais de insetos (SÁNCHEZ-GRACIA; VIEIRA; ROZAS, 2009; VIEIRA; ROZAS, 2011; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014; BENTON, 2015) e da família multigênica da Ubiquitina (NEI; ROGOZIN; PIONTKIVSKA, 2000); além de ter sido sugerido por Makałowska, Lin e Hernandez (2007) como uma das prováveis causas da ocorrência e desaparecimento de sobreposições gênicas, ou seja, de sequências intrônicas ou exônicas que foram - ou ainda são - compartilhadas entre os diversos grupos de vertebrados ao longo da evolução.

Por outro lado, cabe ressaltar que algumas famílias multigênicas exibem mecanismos evolutivos ainda mais complexos, podendo envolver, inclusive, a mescla entre os mecanismos de evolução em concerto e os mecanismos de evolução por Nascimento e Morte. É o caso, por exemplo, dos genes de 5S rDNA de peixes (NEI; ROONEY, 2005; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012; REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013), que será tratado a seguir.

2.6.3.3 Mecanismos mistos de evolução de famílias multigênicas: O caso do 5S rDNA

As cópias dos genes de 5S rDNA exibem uma aparente homogeneidade em sua sequência de aproximadamente 120 pb tida como conservada mesmo entre grupos não relacionados filogeneticamente, o que levou a crer que esta família multigênica, assim como os demais genes ribossômicos, exibiria um padrão clássico de Evolução Concertada. Entretanto, a maioria dos achados sobre a evolução em concerto dos rDNAs tiveram como base os genes ribossomais 18S, 28S e 5.8S, os quais diferem do 5S rDNA tanto em número de repetições, quanto em organização genômica e maquinaria transcricional, de forma que nem todos os mecanismos que afetam aqueles genes atuam necessariamente nos genes de 5S rDNA (PINHAL et al., 2011). Do mesmo modo, três características moleculares dos genes de 5S rDNA são cruciais para o esclarecimento de seus mecanismos evolutivos e a sua consequente aproximação dos mecanismos de Nascimento e Morte de Hughes e Nei (1989): a presença de variantes de 5S rDNA, consistindo num sistema dual (principalmente em peixes e moluscos, grupos mais estudados); as altas taxas de pseudogenes observados, e a existência de diferentes tipos de unidades de repetição evidenciadas com base nos espaçadores não transcritos (NTSs) (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012).

Além disso, são vastos os estudos que têm demonstrado a presença de elementos transponíveis (ETs) e outras sequências associadas aos genes de 5S rDNAs de peixes, responsáveis por conferir a esta família multigênica uma variabilidade não encontrada em outras com arranjo em *tandem* (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013). É o caso dos elementos SINE (elementos nucleares intercalados curtos), majoritariamente oriundos dos tRNAs (REBORDINOS; CROSS; MERLO, 2013), também com registros de origem a partir dos 5S rRNAs (KAPITONOV; JURKA, 2003); DNA-satélites como o *HindIII* (CIOFFI; MARTINS; BERTOLLO, 2009); ETs da família *hAT* e espaçadores transcritos internos (ITS) (GLUGOSKI et al., 2018).

De maneira geral, a Evolução Concertada dos genes de 5S rDNA decorre da observação de apenas um tipo deste gene repetido em *tandem*. Esta característica tem sido observada em algumas espécies de moluscos e mesmo de peixes, como é o caso da ostra *Crassostrea angulata*, estudada por Cross, Vega e Rebordinos (2003), na qual apesar de terem sido encontrados dois genes responsáveis pela síntese da subunidade ribossômica menor (5S), estes localizavam-se em pares cromossômicos distintos e apenas um deles, tido como ‘verdadeiro’, exibia repetição em *tandem* e um microssatélite na sua extremidade 3’-supostamente envolvido na manutenção da estabilidade da região (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012). Duas classes de 5S rDNA foram também observadas em condrictes, mais

especificamente em raias (PASOLINI et al., 2006), e no anfíbio *Xenopus laevis*, havendo, neste caso, diferença de expressão entre elas: enquanto a primeira classe era expressa nas células somáticas, a segunda era expressa somente nos oócitos, embora derivasse da classe somática por duplicação gênica (KOMIYA; HASEGAWA; TAKEMURA, 1986). Tais fatos atentam para mecanismos evolutivos que vão além da evolução em concerto.

As divergências entre as sequências de 5S rRNAs randômicas dispostas em *tandem* indica que a taxa de Evolução Combinada é insuficiente para homogeneizar toda a matriz (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2012). Nesse contexto, a evolução por Nascimento e Morte seria o modelo mais apropriado para explicar as variantes de 5S rDNAs encontradas dos diversos grupos estudados, isto porque este mecanismo evolutivo é regido por forte seleção purificadora capaz de acarretar ampla diversificação de sequências tanto dentro como entre espécies. Assim, uma análise de similaridade de sequências de genes que evoluem por Nascimento e Morte entre diferentes espécies, é capaz de revelar a formação de aglomerados de espécies, independentemente das relações filogenéticas entre elas (ao contrário do que se esperaria na evolução em concerto) (VIERNA; GONZÁLEZ-TIZÓN; MARTÍNEZ-LAGE, 2009).

Vários autores corroboram a ideia de que a evolução a longo prazo dos genes de 5S rDNA decorrem de processos mistos, onde a diversidade genética é gerada através da duplicação gênica sucessiva (Nascimento e Morte), seguida pela homogeneização local das diferentes unidades através da Evolução Concertada, provavelmente após a sua transposição física para locais cromossômicos independentes (ROONEY; WARD, 2005; NEI; ROONEY, 2005; FUJIWARA et al., 2009; VIERNA; GONZÁLEZ-TIZÓN; MARTÍNEZ-LAGE, 2009; VIERNA et al., 2011; FREIRE et al., 2010; UBEDA-MANZANARO et al., 2010; PINHAL et al., 2011; VIERNA et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Biodiversity and fisheries management in the Paraná River Basin: successes and failures. In: WOULD FISHERIES TRUST (Org.). **The Blue Millennium Project: Managing Fisheries for Biodiversity**. Victoria: Would Fisheries Trust-CRDI - UNEP, 2002. 30p.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007. 501p.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 374-400.

ÁGUAS-SC. **Plano de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio das Antas, Bacias Contíguas e Afluentes do Peperi-Guaçu**. Disponível em: <http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib_top/DHRI/Planos%20de%20Bacias/Plano%20da%20Bacia%20Hidrografica%20do%20Rio%20das%20Antas%20e%20Afluentes%20do%20Peperiguacu/produto_b/etapa_b.pdf>. Acesso em 28 Set. 2018.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, M. R.J.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Structure of Genes and Chromosomes. In: **Molecular Biology of the Cell**. p. 405–445, 2007.

ALMEIDA, F.C.; SÁNCHEZ-GRACIA, A.; CAMPOS, J.L.; ROZAS, J. Family Size Evolution in *Drosophila* Chemosensory Gene Families: A Comparative Analysis with a Critical Appraisal of Methods. **Genome Biology and Evolution**. v. 6, p. 1669-1682, 2014.

ANAND, S. Pseudogenes: Function and Origin. **Biotech Articles**, 2011. Disponível em: <https://www.biotecharticles.com/DNA-Article/Pseudogenes-Function-and-Origin-829.html> Acesso em 24 Jul. 2018.

BALAKIREV, E.S.; AYALA, F.J. Pseudogenes: Are they “junk” or functional DNA? **Annual Review of Genetics**. v. 37, p. 123–151, 2003.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C.S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A.G.; DEBONA, T.; FRANA, V.A. **Peixes do Baixo rio Iguaçu**. Maringá: EDUEM, 2012.

BENTON, R. Multigene Family Evolution: Perspectives from Insect Chemoreceptors. **Trends in Ecology & Evolution**. v.30, p. 590-600, 2015.

BROWN, D.D.; WENSINK, P.C.; JORDAN, E. *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. **Journal of Molecular Biology**. v. 63, p.57–73, 1972.

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

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DE SALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 36, p. 135-153, 2005.

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

CAVALLI, D.; FROTA, A.; LIRA, A.D.; GUBIANI, E.A.; MARGARIDO, V.P.; GRAÇA, W.J. Update on the ichthyofauna of the Piquiri River basin, Paraná, Brazil: a conservation priority area. **Biota Neotropica**. v. 18, p. 1-14, 2018.

CIGANDA, M.; WILLIAMS, N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**. v. 2, p. 523–533, 2011.

CIOFFI, M.B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**. v. 10, p. 1-11, 2009.

COOPER, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

COWLEY, M.; OAKEY, R.J. Transposable Elements Re-Wire and Fine-Tune the Transcriptome. **Plos Genetics**. v. 9, p. 1-9, 2013.

CORDAUX, R.; BATZER, M.A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews Genetics**. v.10, p. 691–703, 2009.

CHANDRASEKARAN, C.; BETRÁN, E. Origins of new genes and pseudogenes. **Nature Education**. v. 1, p.181-187, 2008.

CROSS, I.; VEGA, L.; REBORDINOS, L. Nucleolar organizing regions in *Crassostrea angulata*: chromosomal location and polymorphism. **Genetica**. v. 119, p. 65-74, 2003.

DA SILVA, L.L.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic diversity in a population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). **Genetics and Molecular Research**. v. 13, p. 2069-2081, 2014.

D'ERRICO, I.; GADALETA, G.; SACCONI, C. Pseudogenes in metazoa: Origin and features. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**. v. 3, p. 157-167, 2004.

DI PÉRSIA, D.H.; NEIFF, J.J. The Uruguay River System. In: DAVIES, B.R.; WALKER, W.F.; Dr. W. **The Ecology of River Systems**. The Netherlands, 1986. p. 599-621.

EBEHARDT, G.N.; DA SILVA, L.L.L.; DOS SANTOS, A.R.; DIAS, A.L.D. Occurrence of Cytotypes and Variability of AgNORs in a Population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). **Cytologia**. v.74, p. 507-513, 2012.

EIRÍN-LÓPEZ, J.M.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; MARTÍNEZ, A.; MÉNDEZ, J. Birth-and-Death Evolution with Strong Purifying Selection in the Histone H1 Multigene Family and the Origin of orphon H1 Genes. **Molecular Biology and Evolution**. v. 21, p. 1992-2003, 2004.

EIRÍN-LÓPEZ, J.M.; RUIZ, M.F.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; MARTÍNEZ, A.; AUSIÓ, J.; SÁNCHEZ, L.; MÉNDEZ, J. Common Evolutionary Origin and Birth-and-Death Process in the Replication-Independent Histone H1 Isoforms from Vertebrate and Invertebrate Genomes. **Journal of Molecular Evolution**. v. 61, p. 398-407, 2005.

EIRÍN-LÓPEZ, J.M.; REBORDINOS, L.; ROONEY, A.P.; ROZAS, J. The Birth- and- Death Evolution of Multigene Families Revisited. In: GARRIDO-RAMOS, M.A. (Org.) **Repetitive DNA**. Genome Dyn. Basel, 2012. p. 170-196.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler - RS. **U90 - Ijuí**. Disponível em: < http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacia_uru_ijui.asp>. Acesso em 13 Set. 2018.

FERNANDES, C.A.; PISCOR, D.; BAILLY, D.; SILVA, V.F.B.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic Studies Comparing Three Characidae Fish Species from the Iguatemi River Basin, Brazil. **Cytologia**. v.75, p. 329-333, 2010.

FERREIRA, F.W.; HARTMANN, C.; BEUTER, S.B. A ictiofauna e o efeito sinérgico de três PCHS no rio Ijuí, RS. In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, SãoLourenço – MG, 2011. p. 1-3.

FIELD, D.; WILLS, C. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences**. v. 263, p. 209-215, 1998.

FREIRE, R.; ARIAS, A.; INSUA, A.M.; MÉNDEZ, J.; EIRÍN-LÓPEZ, J.M. Evolutionary dynamics of the 5S rDNA gene family in the mussel *Mytilus*: mixed effects of birth-and-death and concerted evolution. **Journal of Molecular Evolution**. v. 70, p. 413–426, 2010.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. *Catalog of Fishes: Genera, Species, References*. California Academy of Sciences. Disponível em: < <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> >. Acesso em: 07 Nov. 2018.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. *Species by Family/Subfamily*. California Academy of Sciences. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 05 Dez. 2018.

FUJIWARA, M.; INAFUKU, J.; TAKEDA, A.; WATANABE, A.; FUJIWARA, A.; KOHNO, S.; KUBOTA, S. Molecular organization of 5S rDNA in bitterlings (Cyprinidae). **Genetica**. v. 135, p. 355–365, 2009.

GANLEY, A.R.D.; KOBAYASHI, T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. **Genome Research**. v. 17, p. 184-191, 2007.

GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetics Genome Research**. v. 146, p. 153–170, 2015.

GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**. v. 8, p. 1-42, 2017.

GIBSON, J.L. Pseudogenes and Origins. **Origins**. v.21, p.91-108, 1994.

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

GT ÁGUAS. Ministério Público Federal: Meio Ambiente e Patrimônio Cultural. **Rio Uruguai e Sua Região Hidrográfica**. Brasília, DF, 2010. 17p.

GUBIANI, E.A.; HOLZBACH, A.J.; BAUMGARTNER, G.; REZENDE NETO, L.B.D.E.; BERGMANN, F. Fish, Piquiri River, Upper Paraná River Basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v.2, p. 09-14, 2006.

GUBIANI, E.A.; GOMES, L.C.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G. Variations in fish assemblages in a tributary of the upper Paraná river, Brazil: a comparison between pre and post-closure phases of dams. **River Research and Application**. v. 26, p.848-865, 2010.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007. 260p.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Genética de populações molecular. In: **Princípios de Genética de Populações**. 4ed. São Paulo: ARTMED SA, 2010.

HOLSINGER, K.E., 2017. Evolution in multigene families. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/911a/d75b7f4c94283918842234b3b19dfc3df1d9.pdf>>. Acesso em 17 Nov. 2018.

HUGHES, A.L.; NEI, M. Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. **Molecular Biology and Evolution**. v. 6, p.559–579, 1989.

IAP (2008a). **Diagnóstico de Recursos Hídricos e Ecossistemas Aquáticos**. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/EIA_RIMA/baciapiquiri/g_V_Diagnostico_Rec_Hidricos_e_Ecossistemas_Aquaticos_III.pdf>. Acesso em 28 Set. 2018.

IAP (2008b). Caracterização da bacia hidrográfica do rio Piquiri (EIA/RIMA). <http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/EIA_RIMA/baciapiquiri/f_IV_Caracterizacao_da_Bacia.pdf> . Acesso em 28 Set. 2018.

INGENITO, L.F. da S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da Bacia do Alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências, Veterinária e Zoologia**, v. 7, p.23-36, 2004.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L.R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**., v. 54, p. 498-511, 2010.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite region in human DNA. **Nature**. v. 314, p. 67-73, 1985.

JEREP, F.C.; SHIBATTA, O.A. A new species of *Bryconamericus* (Characidae: Stevardiinae:Diapomini) from the upper rio Paraná basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, 2017.

JONES, K.W. Satellite DNA. **Journal of Medical Genetics**. v.10, p. 273-281, 1973.

KANEKO, S.; AKI, I.; TSUDA, K.; MEKADA, K.; MORIWAKI, K.; TAKAHATA, N.; SATTA, Y. Origin and Evolution of Processed Pseudogenes That Stabilize Functional *Makorin1* mRNAs in Mice, Primates and Other Mammals. **Genetics**. v. 172, p. 2421-2429, 2006.

KAPITONOV, V.V.; JURKA, J. A Novel Class of SINE Elements Derived from 5S rRNA. **Molecular Biology and Evolution**. v. 20, p. 694-702, 2003.

KOMIYA, H.; HASEGAWA, M.; TAKEMURA, S. Differentiation of oocyte and somatic-type 5S rRNAs in animals. **Journal of Biochemistry**. v. 100, p. 369-374, 1986.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v. 409, p. 860-92, 2001.

LANGGANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**. v. 7, p. 181-197, 2007.

LEVY, S.; SUTTON, G.; NG, P.C.; FEUK, L.; HALPERN, A.L.; WALENZ, B.P.; AXELROD, N.; HUANG, J.; KIRKNESS, E.F.; DENISOV, G. The diploid genome sequence of an individual human. **PLoS Biology**. v. 5, e254, 2007.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; ERRARIS JR., C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of the South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.106-169.

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

MAEDA, T.; KOBAYASHI, Y.; KAMEOKA, H.; OKUMA, N.; TAKEDA, N.; YAMAGUCHI, K.; BINO, T.; SHIGENOBU, S.; KAWAGUCHI, M. Evidence of non-tandemly repeated rDNAs and their intragenomic heterogeneity in *Rhizophagus irregularis*. **Communications Biology**. v. 1, p. 1-13, 2018.

MALE, G.; APPEN, A.; GLATT, S.; TAYLOR, N.M.I.; CRISTOVAO, M.; GROETSCH, H.; BECK, M.; MÜLLER, C.W. Architecture of TFIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. **Nature Communications**. v. 6, p.1-11, 2015.

MAKAŁOWSKA, I.; LIN, C.F.; HERNANDEZ, K. Birth and death of gene overlaps in vertebrates. **BMC Evolutionary Biology**. v. 7, p. 1-13, 2007.

MALABARBA, L.R.; WEITZMAN, S.H. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative Characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia**. v. 16, p. 67-151, 2003.

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

MARTINS, C.; WASKO, A.P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C.R. (Ed.). **Focus on Genome Research**. New York: Science Publishers, 2004. p.289-318.

MATTOX, G.M.T.; BRITZ, R.; TOLEDO-PIZA, M.; MARINHO, M.M.F. *Cyanogaster noctivaga*, a remarkable new genus and species of miniature fish from the Rio Negro, Amazon basin (Ostariophysi: Characidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. v. 23, p. 297-318, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Caderno da região hidrográfica do rio Uruguai**. Brasília: MMA, 2006. 132p.

MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**., v. 25, p. 1-40, 2009.

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

MIRANDE, J.M. Morphology, Molecules and the Phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**. p. 1-19, 2018.

MOREIRA, C.R. **Relações Filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. São Paulo: USP, 2007. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências (Zoologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

NEI, M.; HUGHES, A.L. Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. (Org.) **11th Histocompatibility Workshop and Conference**. Oxford University Press: Oxford, 1992. p. 27-38.

NEI, M.; GU, X.; SITNIKOVA, T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 7799-7806, 1997.

NEI, M.; ROGOZIN, I.B.; PIONTKIVSKA, H. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, p. 10866-10871, 2000.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. **Annual Review of Genetics**. v. 39, p. 121-152, 2005.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V.H. **Fishes of the World**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.

NISHIYAMA, P.B.; ROSSI, M.M.V.; PORTO, F.E.; BORIN, L.A.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; DOS SANTOS, I.C.M. Estudos citogenéticos em espécies de peixes de riachos: *Hyphessobrycon vinaceus*, *Bryconamericus* aff. *iheringii* e *Odontostilbe pequirá* (Characiformes: Characidae). **Evolução e Conservação da Biodiversidade**. v. 6, p.13- 22, 2015.

OHTA, T. On the evolution of multigene families. **Theoretical Population Biology**. v. 23, p. 216-240, 1983.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.S.; ABEL, K.T.; MARIGUELA, T.C.; BENINE, R.C.; ORTÍ, G.; VARI, R.P.; CORRÊA E CASTRO, R.M. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v 11, p. 1-25, 2011.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematics Biology**., v. 46, p. 75-100, 1997.

OTA, R.R.; DEPRÁ, G.C.; GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**. v. 16, p. 1-111, 2018.

PAIM, E.S.; ORTIZ, L.S. **Hidrelétricas na bacia do rio Uruguai: Guia para ONG's e movimentos sociais**. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra Brasil, 2006. 80 p.

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

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

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

PAIZ, L.M. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do Rio Iguçu, Parque Nacional do**

Iguaçu, Brasil. Cascavel: UNIOESTE, 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

PASOLINI, P.; COSTAGLIOLA, D.; ROCCO, L.; TINTI, F. Molecular Organization of 5S rDNAs in Rajidae (Chondrichthyes): Structural Features and Evolution of Piscine 5S rRNA Genes and Nontranscribed Intergenic Spacers. **Journal of Molecular Evolution.** v. 62, p. 564-574, 2006.

PEZER, Z.; BRAJKOVIĆ, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIĆ, Đ. Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation. **Genome dynamics and stability.** v. 7, p. 153–169, 2012.

PIEHLER, A.P.; HELLUM, M.; WENZEL, J.J.; KAMINSKI, E.; HAUG, K.B.; KIERULF, P.; KAMINSKI, W.E. The human ABC transporter pseudogene family: evidence for transcription and gene–pseudogene interference. **BMC Genomics.** v.9, 165, 2008.

PIELER, T.; HAMM, J.; ROEDER, R.G. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. **Cell.** v. 48, p. 91-100, 1987.

PINHAL, D.; YOSHIMURA, T.S.; ARAKI, C.S.; MARTINS, C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. **BMC Evolutionary Biology.** v. 11, p. 1-14, 2011.

PINK, R.C.; WICKS, K.; CALEY, D.P.; PUNCH, E.K.; JACOBS, L.; CARTER, D.R.F. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease?. **RNA.** v.17, p. 792-798, 2011.

PINK, R.C.; CARTER, R.F. Pseudogenes as regulators of biological function. **Essays in Biochemistry.** v.54, p. 103-112, 2013.

PIONTKIVSKA, H.; ROONEY, A.P.; NEI, M. Purifying Selection and Birth-and-death Evolution in the Histone H4 Gene Family. **Molecular Biology and Evolution.** v. 19, p. 689-697, 2002.

PISCOR, D. **Estudos dos cromossomos de espécies alocadas em Incertae sedis (Characiformes, Characidae) com o uso de diferentes marcadores citogenéticos.** São Paulo: UNESP, 2012. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2012.

PISCOR, D.; RIBACINCO-PISCOR, D.B.; FERNANDES, C.A.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus species* (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. **Molecular Cytogenetics.** v. 6, p. 1-13, 2013.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene.** v. 409, p. 72–82, 2008.

PONTE, I.; ROMERO, D.; YERO, D.; SUAUI, P.; ROQUE, A. Complex Evolutionary History of the Mammalian Histone H1.1–H1.5 Gene Family. **Molecular Biology and Evolution**. v. 34, p. 545-558, 2017.

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

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

RAMEL, C. Mini- and Microsatellites. **Environmental Health Perspectives**. v. 105, p. 781-789, 1997.

REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A. High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 141, p. 103-113, 2013.

REIS, R.E. Family Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDERS, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check list of the fresh water fishes of south and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 291-309.

REIS, R.E.; ALBERT, J.S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.M.; PETRY, P.; ROCHA, L.A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**. p. 1-36, 2016.

RICH, J.; OGRYZKO, V.V.; PIROZHKOVA, I.V. Satellite DNA and related diseases. **Biopolymers and Cell**. v. 30, p. 249-259, 2014.

ROONEY, A.P.; PIONTKIVSKA, H.; NEI, M. Molecular Evolution of the Nontandemly Repeated Genes of the Histone 3 Multigene Family. **Molecular Biology and Evolution**. v. 19, p. 68-75, 2002.

ROONEY, A.P. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. **Molecular Biology and Evolution**. v. 21, p. 1704-1711, 2004.

ROONEY, A.P.; WARD, T.J. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, p. 5084–5089, 2005.

SALLUN, A.E.M.; SUGUIO, K.; STEVAUX, J.C. Proposição formal do Alogruppo Alto rio Paraná (SP, PR e MS). **Geologia USP: Série Científica**. São Paulo, v.7, p. 49-70, 2007.

SÁNCHEZ-GRACIA, A; VIEIRA, F.G.; ROZAS, J. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. **Heredity**. v. 103, p. 208-216, 2009.

SANTOS, A.G.; RUBERT, M.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai*

(Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**. v. 149, p. 24-33, 2012.

SEMA. Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná**. Curitiba, PR, 2010. 140p.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**. v.11, p.513-522, 1994.

SILVA, R.N. **Diversidade espacial e temporal da ictiofauna do alto rio Uruguai: aliando técnicas de geoprocessamento**. Florianópolis: UFSC, 2014. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SEMA-RS. Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Rio Grande do Sul. **U090 - Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/u090-bacia-hidrografica-do-rio-ijui>>. Acesso em 13 Set. 2018.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, p. 6241-6246, 2012.

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

SMITH, M.W.; MESKAUSKAS, A.; WANG, P.; SERGIEV, P.V.; DINMAN, J.D. Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**. v. 21, p. 8264-8275, 2001.

SPAHN, C.M.; BECKMANN, R.; ESWAR, N.; PENCZEK, P.A.; SALI, A.; BLOBEL, G.; FRANK, J. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*-tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. **Cell**. v. 107, p. 373-386, 2001.

THOMAZ, A.T.; ARCILA, D.; ORTÍ, G.; MALABARBA, L.R. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, p. 1-25, 2015.

TOLEDO-PIZA, M.; MATTOX, G.M.T.; BRITZ, R. *Priocharax nanus*, a new miniature characid from the rio Negro, Amazon basin (Ostariophysi: Characiformes), with an updated list of miniature Neotropical freshwater fishes. **Neotropical Ichthyology**. v. 12, p. 229-246, 2014.

TOUSSAINT, A.; CHARPIN, N.; BROSSE, N.; VILLÉGER, S. Global functional diversity of freshwater fish is concentrated in the Neotropics while functional vulnerability is widespread. **Scientific Reports**. v. 6, p. 1-9, 2016.

TURNPENNY, P.D.; ELLARD, S. Emery's Elements of Medical Genetics. Philadelphia: Elsevier, 2012. 464p.

UBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. **Genome**. v. 53, p. 723-730, 2010.

USP. Biologia Molecular - Texto 9 Aspectos da Complexidade dos genomas. Disponível em: < <https://edisciplinas.usp.br/course/view.php?id=33438>>. Acesso em: 15 Dez. 2018.

VARANI, A.M.; CARVALHO, L.C.B.; ZERILLO, M.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.M. Elementos de Transposição: Classificação e Mecanismos de Mobilização. In: CARARETO, C.M.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; SLUYS, M.A. **Elementos de Transposição: Diversidade, evolução, aplicações e impactos no genoma dos seres vivos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética/FIOCRUZ, 2015. p. 11-42.

VELDHOEN, N.; YOU, Q.; SETZER, D. R.; ROMANIUK, P. J. Contribution of Individual Base Pairs to the Interaction of TFIIIA with the *Xenopus* 5S RNA Gene. **Biochemistry**. v. 33, p. 7568–7575, 1994.

VENKATESWARLU, K.; LEE, S.W.; NAZAR, R.N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. **Gene**. v. 105, p. 249–253, 1991.

VIEIRA, F.G.; ROZAS, J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. **Genome Biology and Evolution**. v. 3, p. 476–490, 2011.

VIERNA, J.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; MARTÍNEZ-LAGE, A. Long-term Evolution of 5S Ribosomal DNA Seems to be Driven by Birth-and-death and Selection in *Ensis* Razor Shells (Mollusca: Bivalvia). **Biochemical Genetics**, v. 47, p. 635–644, 2009.

VIERNA, J.; JENSEN, K.T.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M. The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). **Heredity**. v. 107, p. 127–142, 2011.

VIERNA, J.; WEHNER, S.; SIEDERDISSEN, C.H.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; MARZ, M. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. **Heredity**. v. 111, p. 410-421, 2013.

WALSH, J.B.; STEPHAN, W. Multigene Families: Evolution. **Encyclopedia of Life Sciences**. DOI:10.1038/npg.els.00017021

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

WATERBORG, J. H. Evolution of histone H3: emergence of variants and conservation of post-translational modification sites. **Biochemistry and Cell Biology**. v. 90, p.79–95, 2012.

WEISS, E.H.; MELLOR, A.L.; GOLDEN, L.; FAHRNER, K.; SIMPSON, E., HURST, J.; FLAVELL, R.A. The structure of a mutant H-2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events. **Nature**. v. 301, p. 671-674, 1983.

WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 161-170.

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

CAPÍTULO 1

Marcadores citogenéticos como ferramentas na delimitação de espécies em um grupo de peixes neotropicais altamente diverso

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Neotropical Ichthyology*.

Marcadores citogenéticos como ferramentas na delimitação de espécies em um grupo de peixes neotropicais altamente diverso

Anahiê Bortoncello Prestes¹, Aline Nardelli², Leonardo Marcel Paiz², Mariane Gavazzoni¹, e Vladimir Pavan Margarido^{1,2}

¹ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Biologia, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brasil. (ABP) anahie94@gmail.com, (MG) marianebio05@hotmail.com, (VPM) vladimir.margarido@unioeste.br (autor correspondente)

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Rua Universitária, 2069, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil. (AN) alinenardellibio@gmail.com, (LMP) leonardo_paiz@hotmail.com

Resumo

Bryconamericus aff. *iheringii* (rio Ijuí, Alto rio Uruguai/ rio Iguaçu, Baixo rio Paraná), *B. coeruleus* (rio Piquiri, Alto rio Paraná), *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* (riacho Bigua, Alto rio Uruguai) apresentaram $2n=52$ cromossomos, com variação interpopulacional/interespecífica de fórmulas cariotípicas e número fundamental. Heterocromatinas foram evidenciadas nas regiões pericentromérica, telomérica e intersticial (em alguns cromossomos), e embora não haja um padrão geral de distribuição, esta característica se mostrou um importante marcador citogenético. RONS simples foram encontradas em *Bryconamericus* cf. *eigenmanni*, *B. cf. ecai* e *B. aff. iheringii* (Iguaçu), e múltiplas nas demais espécies e populações, com a ocorrência de dois padrões em *B. aff. iheringii* (Ijuí) e três em *B. coeruleus*. A 5S/18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONS e mostrou cístrons simples de 5S rDNA apenas em *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Iguaçu), evidenciando um padrão disperso de ambos os genes, muitas vezes co-localizados, nas demais espécies. Os dados deste trabalho corroboram a ocorrência de rearranjos cromossômicos (inversão pericêntrica) e contribuem para a caracterização citogenética do gênero. A co-localização dos genes ribossomais pode representar uma condição plesiomórfica para o grupo, e sua dispersão no cariótipo sugere a ocorrência de eventos de duplicação, pseudogenização e transposição mediada por elementos genéticos móveis.

Palavras-chave:

5S rDNA e 18S rDNA co-localizados, Rearranjos Cromossômicos, Variação intra e interespecífica.

Running head:

Citogenética básica e molecular em *Bryconamericus*: AgRONS, Bandamento C, FISH e Giemsa.

Introdução

Dentre os actinopterígeos, Characiformes é uma das ordens mais representativas da região Neotropical, sendo composta por 2.212 espécies alocadas em 24 famílias, das quais Characidae é a mais representativa, com 1.178 espécies válidas (Fricke, Eschmeyer, Fong, 2018) e a característica de englobar grupos que exibem lacunas em suas relações morfológicas e sistemáticas. Em Characidae, *Bryconamericus* Eigenmann (1907) é um dos gêneros mais diversos, com 56 espécies (Fricke, Eschmeyer; Van der Laan, 2018) distribuídas desde as bacias cis e trans andinas do Panamá, na América Central, até o norte da Argentina, na América do Sul (Jerep, Shibatta, 2017; Mirande, 2018).

A filogenia de *Bryconamericus* é bastante controversa, e até o momento não foram encontradas evidências de monofiletismo. Géry (1977) propôs sua alocação em Tetragonopterinae, o que foi refutado por Lima *et al.* (2003) que colocaram o gênero em *incertae sedis* dentro de Characidae. No mesmo ano, Malabarba e Weitzman propuseram a primeira filogenia para a família tendo como base caracteres osteológicos, e atribuíram *Bryconamericus* e outros gêneros *incertae sedis* ao chamado “Clado A”. Mirande (2009), a partir de caracteres morfológicos, atribuiu provisoriamente muitos dos gêneros *incertae sedis* a clados previamente identificados, incluindo *Bryconamericus* que passou a compor o “Clado Stevardiinae”. Javonillo *et al.* (2010) mantiveram *Bryconamericus* em *incertae sedis* dentro do chamado “Clado A”, que continha também duas subfamílias de Characidae (Glandulocaudinae e Stevardiinae) e outros gêneros *incertae sedis*. Mirande (2010), Oliveira *et al.* (2011), Thomaz *et al.* (2015) e Mirande (2018) propõem *Bryconamericus* como um grupo polifilético dentro de Stevardiinae, mas apenas a filogenia de Mirande (2018) restringe o gênero à tribo Diapomini.

Apesar da representatividade do gênero, poucas espécies de *Bryconamericus* têm sido alvo de estudos citogenéticos e moleculares, e os dados obtidos restringem-se, em sua maioria, à bacia do Alto rio Paraná, onde são encontradas quatro espécies deste gênero: *B. exodon* (espécie-tipo), *B. iheringii*, *B. turiuba* e *B. coeruleus* (citada anteriormente como *Bryconamericus* aff. *iheringii*), esta descrita por Jerep, Shibatta (2017), e encontrada nas bacias dos rios Ivaí, Piquiri e Tibagi, sintópica a outros Stevardiinae.

Os estudos de citogenética básica e molecular (Giemsa, AgRONS, Bandamento C e Hibridização *in situ* - FISH) em *Bryconamericus* corroboram o número diploide de 52 cromossomos, e a distribuição da heterocromatina predominantemente centromérica/pericentromérica e terminal/telomérica, com padrões específicos para cada

espécie e população. Em contrapartida, há grande divergência de fórmulas cariotípicas, número fundamental (NF), número e pares de cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e dos cístrons de 18S e 5S rDNA, dentro e entre espécies, e mesmo entre indivíduos de uma mesma população.

Paintner-Marques *et al.* (2002a, b) encontraram $2n=52$ cromossomos em *Bryconamericus* aff. *exodon* do Córrego Três Bocas (bacia do rio Tibagi), com a presença de dois citótipos: $16m+12sm+6st+18a$ (NF=82); $10m+24sm+6st+12a$ (NF=92), e variação de dois a cinco cromossomos portadores das RONs, as quais foram confirmadas pela 18S rDNA-FISH, que revelou oito sítios desse gene. Portela-Castro *et al.* (2008) também encontraram dois citótipos em *Bryconamericus coeruleus* (citado como *B. aff. iheringii*) do ribeirão Keller (bacia do rio Ivaí): $12m+18sm+8st+14a$ (NF= 90); $8m+28sm+6st+10a$ (NF=94), diferindo do citótipo observado por Paintner-Marques *et al.* (2003): $8m+22sm+10st+12a$ (NF= 92) na população do rio Água da Floresta (bacia do rio Tibagi). Esta população apresentou RONs simples, confirmadas através da FISH, e um padrão de heterocromatina centromérico-telomérico na maioria dos cromossomos.

Capistano *et al.* (2008) encontraram três citótipos para três populações de *Bryconamericus coeruleus* dos sistemas hidrográficos dos rios Paranapanema e Ivaí: $12m+18sm+8st+14a$ (FN= 90) (Córrego Maringá), $8m+28sm+6st+10a$ (FN= 94) (Ribeirão Keller), e $8m+20sm+8st+16a$ (FN=88) (Córrego Tatupeba), as duas primeiras populações com RONs múltiplas e a última com RONs simples. O citótipo dos indivíduos do Ribeirão Keller diferiu em relação aos dois citótipos relatados por Portela-Castro *et al.* (2008) para a mesma população. A 18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONs e evidenciou cístrons extras deste gene para as duas primeiras populações, assim como relatado por Paintner-Marques *et al.* (2002b).

A técnica de FISH com sondas de 5S rDNA foi realizada em *Bryconamericus* apenas por Piscor *et al.* (2013) em *B. turiuba* (rio Passa-Cinco) e *B. cf. iheringii* (afluente do rio Corumbataí), e por Santos *et al.*, (2017) em *B. ecai* (rio Forquetinha), e em duas populações de *Bryconamericus* sp. (Córrego Vermelho e rio Cambutá), revelando cístrons simples apenas em *B. cf. iheringii* e *Bryconamericus* sp. do rio Cambutá, com a presença de sintenias 5S/18S rDNA em *B. cf. iheringii*, nos citótipos V e VII de *B. ecai* e em *Bryconamericus* sp. do córrego Vermelho.

O presente trabalho utiliza técnicas de citogenética básica (Giemsa, Bandamento-C e AgRONs) e molecular (FISH com sondas de 18S e 5S rDNA) como marcadores na diferenciação de quatro espécies de *Bryconamericus*, sendo duas populações de *B. aff.*

iheringii (Boulenger, 1887) (bacia do Alto rio Uruguai e bacia do Baixo rio Iguaçu), e uma população de *B. cf. eigenmanni* (Evermann & Kendall, 1906), *B. cf. ecai* Silva, 2004 (bacia do Alto rio Uruguai), e *B. coeruleus* Jerep & Shibatta, 2017 (bacia do Alto rio Paraná).

Materiais e Métodos

Foram coletados exemplares de quatro espécies de *Bryconamericus*: 4 machos e 5 fêmeas de *B. aff. iheringii* do rio Ijuí, bacia do Alto rio Uruguai (Estado do Rio Grande do Sul) (28°18'06.3"S/53°53'33.6"O); 1 macho e 3 fêmeas de *B. aff. iheringii* do rio Iguaçu, bacia do Baixo rio Iguaçu (Estado do Paraná) (25°37'13.20"S/54°23'29.20"O); 13 machos e 4 fêmeas de *B. coeruleus* do rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná (Estado do Paraná) (24°56'54"S/52°35'49"O); 1 macho e 5 fêmeas de *B. cf. ecai*, e 1 macho de *B. cf. eigenmanni* do riacho Bigua, bacia do Alto rio Uruguai (Estado de Santa Catarina) (26°53'22.5"S/53°23'03.1"O) (Tab. 1). Os indivíduos foram anestesiados e sacrificados por overdose de óleo de cravo (Griffiths, 2000) conforme Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas da Unioeste (Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste), e depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil. As preparações cromossômicas seguiram a metodologia proposta por Bertollo *et al.* (1978), e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram evidenciadas através da impregnação por nitrato de prata, conforme Howell, Black (1980). O bandamento-C foi utilizado para determinar as regiões heterocromáticas seguindo a técnica proposta por Sumner (1972), com coloração por iodeto de propídio (Lui *et al.*, 2012). O mapeamento físico das sequências de 5S e 18S rDNA foi realizado através da *double-FISH*, de acordo com Pinkel *et al.* (1986) e modificações sugeridas por Margarido, Moreira Filho (2008), utilizando sondas obtidas de *Megaleporinus elongatus* Valenciennes, 1850 (Martins, Galetti-Jr, 1999) e de *Prochilodus argenteus* Spix e Agassiz, 1829 (Hatanaka, Galetti-Jr 2004), respectivamente. As sondas de 5S rDNA foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Dig Nick Translation Kit–Roche®, Basel, BS, Switzerland), e a de 18S rDNA com biotina-16-dUTP (Biotin Nick Translation Kit–Roche®). A detecção e amplificação dos sinais foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche®) para sonda de 5S rDNA, e avidina-FITC amplificado com anti-avidina biotilada (Sigma-Aldrich, Buchs, SG, Switzerland) para sonda de 18S rDNA, sendo os cromossomos posteriormente contracolorados com DAPI (50 µg/mL). As melhores metáfases foram fotografadas utilizando o software DP Controller 3.2.1.276 e a câmera digital Olympus DP 71 acoplada ao microscópio de epifluorescência BX 61(Olympus America Inc., Center Valley,

PA, United States of America). Os cromossomos-homólogos foram pareados e classificados de acordo com a relação de braços (q/p) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a), como proposto por Levan *et al.* (1964).

Resultados

Bryconamericus aff. iheringii

As duas populações de *Bryconamericus aff. iheringii* apresentaram o número diploide de 52 cromossomos, divergindo quanto à fórmula cariotípica e o número fundamental: 10m+16sm+14st+12a (NF= 92) para *B. aff. iheringii* do rio Ijuí, e 10m+10sm+16st+16a (NF= 88) para *B. aff. iheringii* do rio Iguazu, que apresentou RONS simples na região terminal do braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 22. Em *Bryconamericus aff. iheringii* do rio Ijuí foram observados dois padrões de localização de RONS, onde alguns indivíduos exibiram marcações na região terminal do braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 26 e em um cromossomo acrocêntrico do par 25, o que chamamos de 'Padrão I', enquanto em outros a terceira marcação foi evidenciada no primeiro cromossomo do par acrocêntrico 21, o chamado 'Padrão II' (Figs. 1-4a-b). Nas duas populações a localização das RONS foi confirmada pela 18S rDNA-FISH (Fig. 3a-b). O bandamento C evidenciou heterocromatinas na região pericentromérica de quase todos os cromossomos, além de revelar blocos conspícuos na região terminal dos pares de cromossomos correspondentes às RONS, e blocos pálidos em ambos os braços do par metacêntrico 01 para ambas as populações. *Bryconamericus aff. iheringii* do rio Ijuí apresentou ainda heterocromatinas subterminais/terminais no braço longo do par acrocêntrico 22, enquanto a população do rio Iguazu diferiu pela presença de heterocromatinas intersticiais no braço longo do par de cromossomos subteloicêntricos 15. Cabe ressaltar que o padrão II apresentou maior número de cromossomos com regiões heterocromáticas pericentroméricas quando comparado ao Padrão I, como sistematizado no ideograma da Figura 4a. A 5S rDNA-FISH evidenciou cístrons simples na região terminal do braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 24 na população do rio Iguazu (Fig. 3b), e do par 26, sintênico aos cístrons de 18S rDNA para os indivíduos do rio Ijuí que apresentaram o padrão II, e 4 cístrons de 5S rDNA para os indivíduos que apresentaram o padrão I (Fig. 3a, nas caixas), sendo 3 deles sintênicos aos cístrons de 18S rDNA e o outro localizado na região terminal do braço curto do primeiro cromossomo do par submetacêntrico 7 (Fig. 3a).

Bryconamericus coeruleus

O número diploide observado foi de 52 cromossomos, com fórmula cariotípica de 14m+20sm+8st+10a (NF= 94). Foram encontrados pelo menos três padrões de RONS para esta população sendo denominados como I, II e III. O padrão I foi caracterizado pela presença de pelo menos cinco cromossomos portadores destas regiões (pares metacêntricos 3 e 4, e um dos cromossomos do par subtelocêntrico 11 - Fig. 1c, caixa I), enquanto os outros dois padrões apresentaram quatro cromossomos portadores, os quais diferiram entre si (par de cromossomos submetacêntricos 9, e um dos cromossomos dos pares metacêntrico 4 e submetacêntrico 17 para o padrão II, e no par de cromossomos metacêntricos 4 e num dos cromossomos dos pares subtelocêntricos 20 e acrocêntricos 24, presente na região terminal do braço longo deste cromossomo para o padrão III - Fig. 1c caixas II e III, respectivamente). O bandamento C evidenciou heterocromatinas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, e terminal de alguns pares além daqueles correspondentes às RONS, como os pares 1 (ambos os braços), 2, 6, 9, 11 (apenas no braço curto) e 23 (apenas no braço longo) dos indivíduos que apresentaram o padrão I (Figs. 2c e 4c-I), diferindo do padrão II onde apenas o par de cromossomos metacêntricos I exibiu heterocromatinas terminais, em ambos os braços. Este padrão diferiu ainda pela presença de uma banda pericentromérica/intersticial no braço longo do par de cromossomos acrocêntricos 26 (Fig. 4c-II). O padrão III apresentou regiões heterocromáticas similares às do padrão I, exceto pelas heterocromatinas associadas às RONS, cujos pares de cromossomos portadores diferiram entre os dois padrões (Fig. 4c-III). A 18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONS e evidenciou cópias extras para todos os indivíduos, confirmando as divergências de localização entre os padrões também quanto aos cópias deste gene. Os padrões I e III apresentaram seis cópias de 18S rDNA, diferindo quanto à localização (região terminal do braço curto dos pares de cromossomos metacêntricos 3 e 4, e submetacêntricos 11 para o padrão I, e na região terminal do braço curto dos pares metacêntricos 4 e subtelocêntricos 20, e em um dos cromossomos dos pares metacêntricos 3 e acrocêntricos 24 - braço longo; Figs. 3c - I, III), enquanto o padrão II apresentou nove cópias deste gene (região terminal do braço curto dos pares de cromossomos metacêntricos 3 e 4, acrocêntricos 25, e em um dos cromossomos dos pares submetacêntricos 9, 17 e 26 - Fig. 3c). A 5S rDNA-FISH revelou um padrão de dispersão deste gene no cariótipo, com variação intrapopulacional de 10 a 11 cópias, todos restritos à região subterminal/terminal do braço curto, a exceção de um indivíduo que apresentou o padrão III onde um cópia de 5S rDNA foi evidenciado na região subterminal do braço longo

do par de cromossomos acrocêntricos 24. Os três padrões exibiram vários cístrons de ambos os genes ribossomais colocalizados (sintênicos). Foram quatro cromossomos sintênicos no padrão I, seis nos padrões II e III, e cinco no padrão II, além de mais seis cístrons de 5S rDNA para o padrão I e quatro para os padrões II e III, totalizando 10 cístrons para os três padrões (Figs. 3c, 4c I-II).

Bryconamericus cf. ecai

O número diploide observado foi de 52 cromossomos, com fórmula cariotípica igual a $10m+16sm+14st+12a$ (NF= 92), e a presença de RONS simples localizadas na região terminal do par de cromossomos subtelocêntricos 16 (Fig. 1d). O bandamento C revelou heterocromatinas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, intersticial no braço longo do par de cromossomos submetacêntricos 10, e terminal nos pares de cromossomos metacêntricos 1 e 2 (ambos os braços), submetacêntricos 10, subtelocêntricos 14, 15 e 16, e acrocêntricos 21, 24 e 26 (apenas no braço longo para todos). No par de cromossomos acrocêntricos 25 o braço curto mostrou-se totalmente heterocromático, diferentemente do par portador das RONS, que nesta espécie não apresentou bandas heterocromáticas fortemente marcadas (Figs. 2d, 4d). A 18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONS, e evidenciou cístrons extras na região terminal do braço curto do par de cromossomos acrocêntricos 25, em ambos os casos em sintonia aos cístrons de 5S rDNA evidenciados pela 5S rDNA-FISH (Figs. 3d, 4d).

Bryconamericus cf. eigenmanni

O número diploide observado foi de 52 cromossomos, com fórmula cariotípica igual a $6m+16sm+16st+14a$ (NF= 90) e a presença de RONS simples localizadas na região terminal do par de cromossomos acrocêntricos 25 (Fig. 1e). O bandamento C evidenciou heterocromatinas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, intersticial no braço longo dos pares de cromossomos submetacêntricos 8 e acrocêntricos 26, e terminal no braço curto dos pares submetacêntricos 4, 9 e 10, e no braço longo dos pares submetacêntricos 4, 5, 6, 7, 8 e 11, subtelocêntricos 16, e acrocêntricos 20, 21, 23 e 26. O par de cromossomos portador das RONS (par 25) apresentou o braço curto correspondente à região totalmente heterocromático (Figs. 2e, 4e). A 18S rDNA-FISH confirmou a localização das RONS e evidenciou dois cístrons extras, no braço curto de um dos cromossomos dos pares

acrocêntricos 20 e 26. A 5S rDNA-FISH evidenciou 5 cístrons deste gene, 4 deles sintênicos aos genes de 18S rDNA, e o outro localizado no braço curto do primeiro cromossomo do par acrocêntrico 26 (Figs. 3e, 4e).

Discussão

Os estudos citogenéticos em *Bryconamericus* apontam para o número diploide de 52 cromossomos, conservado e considerado o ancestral do gênero (Wasko, Galetti-Jr, 1998), com variação inter e intra populacional/específica quanto à macroestrutura cariotípica e o número fundamental, que varia de 80 no citótipo I de *B. ecai*, a 100 no citótipo IV de *B. ecai* (Santos et al., 2012), e nos citótipos V e VI de *B. coeruleus* (Silva et al., 2014) (Tab. 2). Segundo Wasko, Galetti-Jr (1998), a variação no número fundamental sem a alteração no número diploide compreende, em termos evolutivos, a ocorrência de rearranjos cromossômicos, possivelmente do tipo inversão pericêntrica, que atuam no processo de diversificação deste grupo de peixes. Nota-se que o que ocorre em *Bryconamericus* difere, por exemplo, do observado em *Rineloricaria* sp., onde a variação cariotípica é acompanhada pela alta divergência intraespecífica, interpopulacional e interespecífica de número diploide (Kavalco et al., 2005), decorrente de eventos de fusão e fissão cêntrica, muitas vezes acompanhados de inversões e translocações, comuns em Loricariinae (Kavalco et al., 2005; Rosa et al., 2012; Blanco et al., 2013; Primo et al., 2017).

A maioria dos estudos citogenéticos em *Bryconamericus* fazem referência à *B. coeruleus* (citado como *B. aff. iheringii*) da bacia do Alto rio Paraná. Os resultados obtidos no presente estudo para *Bryconamericus coeruleus* do rio Piquiri mostram que a fórmula cariotípica desta população se assemelha ao citótipo II encontrado por Ebehardt et al. (2012) na população do córrego Três Bocas (Estado do Paraná), diferindo quanto a um par de cromossomos submetacêntricos/subtelocêntricos, e mantendo o mesmo NF=94. Nesta espécie o NF varia de 84 (Ebehardt et al., 2012) a 100 (Silva et al., 2014), sendo 94 o número mais frequente, presente em 33% dos citótipos (Tab. 2).

As duas populações de *Bryconamericus aff. iheringii* analisadas apresentaram macroestrutura cariotípica diferentes entre si e em comparação a *B. cf. iheringii* de um afluente do rio Corumbataí (Estado de São Paulo) estudada por Piscor et al. (2013), divergindo ainda quanto ao número fundamental, que variou de 88 em *B. aff. iheringii* do rio Iguaçu, a 94 em *B. cf. iheringii* (Piscor et al., 2013), e ao número de cromossomos acrocêntricos, que se sobressaiu na população do rio Iguaçu, embora as três populações tenham apresentado 10 cromossomos metacêntricos (Tab. 2).

Bryconamericus cf. ecai do presente estudo apresentou fórmula cariotípica e número fundamental distintos de todos os citótipos de *B. ecai* do rio Forquetinha (Santos *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2017), mas equivalentes ao encontrado em *B. aff. iheringii* do rio Ijuí, embora esta tenha sido a única característica compartilhada pelas duas espécies. O número fundamental de 92 de *B. cf. ecai* foi intermediário ao relatado para a população estudada por Santos *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2017), cuja variação foi de 80 no citótipo I, a 100 no citótipo IV (Tab. 2).

Este trabalho contempla os primeiros dados citogenéticos para uma população de *Bryconamericus cf. eigenmanni*, e o número fundamental encontrado para esta espécie (NF=90) coincidiu com o relatado para algumas populações de *B. coeruleus*, porém com fórmulas cariotípicas distintas, como é possível observar na Tabela 1.

Os estudos citogenéticos em *Bryconamericus* a partir de Paintner-Marques *et al.*, (2003) têm envolvido a detecção das regiões heterocromáticas através do bandamento C, que revela características relevantes nas análises comparativas. Nas espécies analisadas, observou-se o padrão característico de heterocromatinas predominantes na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, com variação quanto aos cromossomos com heterocromatinas intersticiais e terminais. Blocos heterocromáticos conspícuos na região intersticial dos cromossomos foram encontradas apenas no citótipo IV de *Bryconamericus ecai* estudada por Santos *et al.* (2012), e neste trabalho foi evidenciada apenas em *B. aff. iheringii* do rio Iguaçu, *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* (Figs. 2, 4b,d,e). O padrão II de *Bryconamericus coeruleus* diferiu dos demais pela presença de um bloco heterocromático pericentromérico/instersticial no braço longo do último par de cromossomos acrocêntricos (Fig. 4c-II).

O número de pares de cromossomos com heterocromatinas terminais também possibilitou diferenciar as espécies e populações de *Bryconamericus* deste trabalho (Figs. 2, 4), à excessão das heterocromatinas biterminais do par de cromossomos metacêntricos 1, que foram compartilhadas por todas as espécies e padrões encontrados, exceto *Bryconamericus cf. eigenmanni*. Nesta espécie, o mesmo padrão de heterocromatinas foi evidenciado no primeiro par de cromossomos submetacêntricos (par 4), sugerindo que estes cromossomos possam ter sido cromossomos metacêntricos que sofreram inversão pericêntrica, de forma que todos possivelmente compartilham as mesmas sequências nestas regiões. Variações na distribuição de heterocromatinas terminais também foram descritas por Portela-Castro *et al.* (2008) nos três citótipos de *B. coeruleus*, que apesar de exibirem regiões heterocromáticas pericentroméricas, variaram quanto aos pares portadores de heterocromatinas teloméricas. De acordo com Wasko, Galetti-Jr. (1998), as espécies de *Bryconamericus* não parecem revelar

uma tendência geral em relação à distribuição da heterocromatina, de forma que cada espécie pode ser caracterizada por um padrão específico de bandas-C, como observado neste estudo.

Quanto aos cromossomos portadores das RONS, das espécies analisadas apenas *Bryconamericus* aff. *iheringii* (rio Iguaçu), *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* apresentaram um único padrão de RONS simples (Figs. 1, 4b,d,e). *Bryconamericus* aff. *iheringii* (rio Ijuí) exibiu dois padrões de RONS múltiplas, ambos com 3 cromossomos portadores destas regiões (Figs. 1a; 4a), enquanto em *B. coeruleus* foi possível identificar três padrões distintos (padrão I: cinco cromossomos portadores; padrões II e III: quatro cromossomos portadores) (Figs. 1c; 4c). A presença de RONS simples é considerada ancestral para peixes (Amemiya, Gold, 1988), e é menos recorrente em *Bryconamericus* do que a ocorrência de RONS múltiplas, como evidenciado na Tabela 1.

Embora a impregnação por prata tenha revelado RONS simples em algumas espécies deste trabalho, a 18S rDNA-FISH evidenciou a presença de sítios múltiplos deste gene para todas, exceto *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguaçu. As RONS identificadas por impregnação de prata correspondem apenas a locais ativos na intérfase anterior (Piscor *et al.*, 2013), o que explica os pares adicionais revelados pela FISH, e que são transcritionalmente inativos devido a mecanismos de regulação da atividade genética (Paintner-Marques *et al.*, 2002b). Segundo Machado *et al.* (2017), a presença de múltiplas sequências de 18S rDNA dispersas no genoma pode refletir a amplificação e dispersão desses genes, mediadas pela sua associação a elementos genéticos móveis (transposons e/ou retrotransposons). Sítios múltiplos de 18S rDNA em indivíduos que haviam apresentado RONS simples foram relatados também por Piscor *et al.* (2013) em *B. turiuba*, enquanto sítios simples foram encontrados em algumas populações de *B. coeruleus* (Paintner-Marques *et al.*, 2003; Capistano *et al.*, 2008 - Córrego Tatupeba; Silva *et al.* (2014) - citótipo I; Nishiyama *et al.*, 2015), em *B. cf. iheringii* (Piscor *et al.*, 2013) e nos citótipos II e IV de *B. ecai* (Santos *et al.*, 2012) (Tab. 2).

A análise dos cromossomos portadores das RONS permite a diagnose de heteromorfismo intraindividual de tamanho da região entre os cromossomos homólogos em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguaçu, *B. coeruleus* (padrões I e III: par 4; Padrão II: par 9), e em *B. cf. ecai* do presente estudo (Fig. 1b, c, d), o qual foi confirmado através da 18S rDNA-FISH, revelando que nestas espécies há, de fato, variação no número de cópias deste gene ribossomal, decorrente de eventos de duplicação ou deleção ocorridos durante a meiose. Considerações similares foram feitas Piscor *et al.* (2013) em *B. cf. iheringii* e Santos *et al.* (2017) em *Bryconamericus* sp. (Grupo 1), mas em ambos os casos a 18S rDNA-FISH detectou sítios de tamanho similar, indicando que a variação visualizada pela impregnação por

prata poderia referir-se a diferenças no grau de condensação entre os cromossomos homólogos e atividade gênica diferencial dos segmentos de rDNA (45S). Resultados similares para este gene ribossômico foram encontrados em outras espécies de peixes, como *Schizodon borelli* (Martins, Galetti Jr., 1998), e *Iheringichthys labrosus* (Carvalho, Dias, 2007). Piscor *et al.* (2018) encontraram heteromorfismo de tamanho das regiões de U2 snDNA em *Piabina argentea*, o que os autores associaram aos mesmos processos de rearranjos meióticos.

A 5S rDNA-FISH revelou a presença destes genes sempre na região terminal dos cromossomos, variando entre sítios simples em *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguazu, e no padrão II da população do rio Ijuí (Figs. 3aII, b e 4aII, b), e múltiplos nas demais espécies e na outra população de *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, padrão I), a maioria dos quais localizados no braço curto dos pares portadores dos genes de 18S rDNA, configurando a localização sintênica dos dois genes ribossomais. Das espécies analisadas, apenas *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguazu apresentou todos os cístrons de 5S rDNA em cromossomos distintos dos portadores dos cístrons de 18S rDNA.

O primeiro trabalho de mapeamento físico dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* foi realizado por Piscor *et al.* (2013), e revelou a ocorrência de sítios simples deste gene em *B. cf. iheringii* e múltiplos em *B. turiuba*, sempre localizados na região terminal do braço curto dos cromossomos, com a presença de sintenia 5S/18S rDNA apenas em *B. cf. iheringii*. Santos *et al.*, (2017) encontraram sítios simples de 5S rDNA e sem co-localizações apenas em *Bryconamericus* sp. do rio Cambutá, evidenciando sintenias 5S/18S rDNA nos citótipos V e VII de *B. ecai*, e em *Bryconamericus* sp. do córrego Vermelho (Grupos 1 e 2). A localização sintênica entre os dois genes ribossomais (5S-18S rDNA) também tem sido evidenciada em outros grupos. É o caso de *Prochilodus lineatus* (Vicari *et al.*, 2006), *Hypostomus commersoni* (Bueno *et al.*, 2014), e das espécies marinhas *Thalassoma noronhanum*, *Halichoeres penrosei*, *H. poeyi*, *H. radiatus* e *H. brasiliensis* (Amorim *et al.*, 2016), e pode compreender uma característica plesiomórfica para os grupos (Vicari *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2016).

Os genes de DNA ribossomais em eucariotos compreendem duas famílias multigênicas: 45S rDNA, transcrita no nucléolo, e 5S rDNA, transcrita fora do nucléolo, sugerindo que o funcionamento diferencial de ambas as famílias requer distanciamento físico (Martins e Galetti-Jr., 2000), evitando assim a ocorrência de interferências disruptivas, como translocações do 5S para o 45S e vice-versa, capazes de afetar a dinâmica de ambas (Martins, Galetti-Jr., 1999). Por outro lado, a medida que as técnicas de *double-FISH* têm sido realizadas, maior é o número de espécies de peixes com localização sintênica destas

sequências. Segundo Schweizer e Loidl (1987), as regiões teloméricas são suscetíveis a transferências equi-locais, mesmo entre braços cromossômicos não homólogos, de acordo com a sua proximidade no núcleo interfásico, promovida pela orientação dos cromossomos de conforme o modelo proposto por Rabl. Assim podemos inferir que em todas as espécies analisadas neste trabalho (exceto *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguaçu que não exibiu sintenias) os eventos de transferência entre as duas famílias multigênicas podem ter sido facilitados.

A grande variação no número de cístrons de 5S rDNA, sobretudo em *Bryconamericus coeruleus*, pode sugerir a ocorrência de eventos de pseudogenização ou a inserção de elementos genéticos móveis nos espaçadores intergênicos do 5S rDNA, promovendo a detecção de sítos “extras” deste gene através da FISH, além daqueles efetivamente funcionais.

Este trabalho traz os primeiros dados citogenéticos para as populações de *Bryconamericus* aff. *iheringii* dos rios Ijuí e Iguaçu, *B. coeruleus* do rio Piquiri, *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* do riacho Bigua, sendo este o primeiro estudo nesta espécie. O número diploide, fórmulas cariotípicas e os números fundamentais corroboram a hipótese da ocorrência de rearranjos cromossômicos, possivelmente inversões pericêntricas, que demonstram a complexidade envolvida na dinâmica evolutiva do grupo. Embora *Bryconamericus* não apresente uma tendência geral de distribuição de heterocromatina, esta característica revelou-se um importante marcador citogenético na diferenciação das espécies e populações analisadas. A localização dispersa dos genes ribossomais (5S-18S rDNA) sugere a ocorrência de ampliações destas sequências, associadas a eventos de duplicação, pseudogenização e transposição mediada por elementos genéticos móveis, e a co-localização destes sítos gênicos em todas as espécies pode representar uma condição plesiomórfica em *Bryconamericus*, embora este grupo careça de dados citogenéticos para melhor compreensão da dinâmica evolutiva destes genes em larga escala.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA / ICMBio) pela autorização da captura de peixes (Licença número: SISBIO 10522-1). Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá (UEM), à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Parque Nacional do Iguaçu, ao Macuco Safari e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Núpelia) pelo apoio logístico. Este estudo foi financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pelo

CNPq (Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela FPTI (Fundação Parque Tecnológico de Itaipu), e realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Número de Licença: Protocolo 13/09 - CEEAAP / Unioeste).

Referências

Amemiya CT, Gold JR: Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North cyprinid fishes. *Genetica*. 1988; 76(2): 81–90.

Amorim KDJ, Cioffi MB, Bertollo LAC, Soares RX, Souza AS, Costa GWWF, Molina WF. Co-located 18S/5S rDNA arrays: an ancient and unusual chromosomal trait in *Julidini* species (Labridae, Perciformes). *Comp Cytogenet*. 2016; 10(4): 555-70.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet*. 1978; 1(1): 103-20.

Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Bertollo LAC, Traldi JB, Moreira-Filho O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Rev Fish Biol Fish*. 2013; 23(1): 127–34.

Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadzki CH, Vicari MR, Margarido VP. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. *SCI World J*. 2014; 2014(1): 1-8.

Capistano TG, Portela-Castro ALB, Julio-Jr HF. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2008; 31(1): 203-07.

Carvalho RA, Dias AL. Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. Braz Arch Biol Technol. 2007; 50(1): 141-46.

Eberhardt GN, Silva LLL, Santos AR, Dias, ALD. Occurrence of Cytotypes and Variability of AgNORs in a Population of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae). Cytologia. 2012; 77(4): 507-13.

Fernandes CA, Piscor D, Bailly D, Silva, VFB, Martins-Santos IC. Cytogenetic Studies Comparing Three Characidae Fish Species from the Iguatemi River Basin, Brazil. Cytologia. 2010; 75(4): 329-33.

Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD, editores. Catalog of Fishes: Species by Family/Subfamily [Internet]. California Academy of Sciences; 2018 [atualizado em 03 de Dezembro de 2018; citado em 20 de Dezembro de 2018]. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.

Fricke R, Eschmeyer WN, Van Der Laan R, editores. Catalog of Fishes: Genera, Species, References [Internet]. California Academy of Sciences; 2018 [atualizado em 03 de Dezembro de 2018; citado em 20 de Dezembro de 2018]. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

Géry J: Characoids of the World. New Jersey: T.F.H. Publications Inc.; 1977

Griffiths SP. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J Fish Biol. 2000; 57(1): 1453-64.

Hatanaka T, Galetti-Jr. PM. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica. 2004; 122(3): 239-44.

Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia. 1980; 36(8): 1014-15.

Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns J. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 2010; 54 (1): 498-511.

Jerep FC, Shibatta, OA. A new species of *Bryconamericus* (Characidae: Stevardiinae: Diapomini) from the upper rio Paraná basin, Brazil. *Neotrop Ichthyol* [online]. 2017; 15 (3): 1-13. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170028>.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity.* 2005; 94(2):180–86.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52(2): 201-20.

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, Jr., organizadores. *Check List of the Freshwater Fishes of the South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p. 106-169.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotech Histochem.* 2012; 87(7): 433-38.

Machado MA, Cardoso AL, Milhomem-Paixão SSR, Pieczarka JC, Nagamachi CY. *Gymnotus coatesi* (Gymnotiformes): A Case of Colocation of Multiple Sites of 18S rDNA with Telomeric Sequences. *Zebrafish.* 2017; 14(5): 459-63.

Malabarba LR, Weitzman SH. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative Characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comun Mus Ciênc Tecnol.* 2003; 16(1): 67-151.

Margarido VP, Moreira-Filho O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genet Mol Biol.* 2008; 31(1): 235-38.

Martins C, Galetti-Jr PM. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. *Genet Mol Biol*. 1998; 21(3): 355-60.

Martins C, Galetti-Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*. 1999; 7(5): 363–67.

Martins C, Wasko AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, editor. *Focus on Genome Research*. Nova Iorque: Nova Science Publishers; 2004. p.289-318.

Martins C, Galetti-Jr PM. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?. *Genetica*. 2001; 111(1-3): 439-46.

Mirande JM. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* [online]. 2009; 25 (1):1-40. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2009.00262.x>.

Mirande JM. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotrop Ichthyol*. 2010; 8 (3): 385-568.

Mirande JM. Morphology, Molecules and the Phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*. 2018; 0: 1-19.

Nishiyama PB, Rossi MMV, Porto FE, Borin LA, Portela-Castro ALB, Santos ICM. Estudos citogenéticos em espécies de peixes de riachos: *Hyphessobrycon vinaceus*, *Bryconamericus* aff. *iheringii* e *Odontostilbe pequirá* (Characiformes: Characidae). *Evol Conserv Biodivers*. 2015; 6(1): 13-22.

Oliveira C, Avelino GS, Abel KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Corrêa E, Castro RM. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. *BMC Evol Biol*. 2011; 11(1): 1-25.

Paintner-Marques TRP, Giuliano-Caetano L, Dias AL. Karyotypic diversity in a *Bryconamericus* aff. *exodon* population (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*. 2002a; 67(4): 397-402.

Paintner-Marques TRP, Giuliano-Caetano L, Dias AL. Multiple NORs in *Bryconamericus* aff. *exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas*. 2002b; 137(2): 107-112.

Paintner-Marques TRP, Giuliano-Caetano L, Dias AL. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus* aff. *Iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). *Genet Mol Biol*. 2003; 26(2): 145-49.

Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* [online]. 2008; 31(1): 222-26. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008000200009>.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(9): 2934-38.

Piscor D, Ribacinco-Piscor DB, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP. Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Mol Cytogenet*. 2013; 6 (13): 1-13.

Piscor D, Fernandes CA, Parise-Maltempi PP. Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species (Characidae, Stevardiinae). *Neotrop Ichthyol*. [online] 2018; 16(1): 1-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170066>.

Portela-Castro ALB, Julio-Jr. HF, Santos ICM, Pavanelli CS. Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica*. 2008, 133 (1): 113-18.

Primo CC, Glugoski L, Almeida MC, Zawadzki CH, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish*. 2017; 14(2): 161-68.

Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish*. 2012; 22(3): 739–49.

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

Santos AR, Usso MC, Gouveia JG, Araya-Jaime C, Frantine-Silva W, Giuliano-Caetano L, Foresti F, Dias AL. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in the Genus *Bryconamericus* (Characidae) and DNA Barcoding to Differentiate Populations. *Zebrafish*. 2017; 14(3): 261-71.

Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias, A.L. Karyotypic diversity in a population of *Bryconamericus aff. iheringii* (Characidae). *Genet Mol Res*. 2014; 13(1): 2069-81.

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*. 1972; 75(1): 304-06.

Thomaz AT, Arcila D, Ortí G, Malabarba LR. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. *BMC Evol Biol*. 2015; 15 (1): 1-25.

Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet Mol Biol*. 2006; 29(4): 621-25.

Wasko AP, Galetti-Jr PM. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cytobios*. 1998; 94(1), 185-193.

Tab. 1 Espécies de *Bryconamericus* coletadas e os respectivos locais de coleta. ♂ = Machos, ♀ = Fêmeas, NUP = Números de comprovação de depósito na Coleção Ictiológica do Nupélia.

Espécie	Localidade	Bacia	Coordenada Geográfica	♂	♀	NUP
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Rio Ijuí	Alto rio Uruguai	28°18'06.3"S/53°53'33.6"O	4	5	14910, 15737
<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Rio Iguaçu	Baixo rio Iguaçu	25°37'13.20"S/54°23'29.20"O	1	3	
<i>Bryconamericus</i> <i>coeruleus</i>	Rio Piquiri	Alto rio Paraná	24°56'54"S/52°35'49"O	13	4	5923
<i>Bryconamericus</i> cf. <i>ecai</i>	Riacho Bigua	Alto rio Uruguai	26°53'22.5"S/53°23'03.1"O	1	5	
<i>Bryconamericus</i> cf. <i>eigenmanni</i>	Riacho Bigua	Alto rio Uruguai	26°53'22.5"S/53°23'03.1"O	1	-	

Tab. 2 Revisão dos dados citogenéticos em *Bryconamericus*. ^aNúmero diploide; ^bNúmero Fundamental; ^cNúmero de cístrons de 18S rDNA; ^dNúmero de cístrons de 5S rDNA; PR = Estado do Paraná; RS = Estado do Rio Grande do Sul; SC = Estado de Santa Catarina; SP = Estado de São Paulo; *Citado como *B. aff. iheringii*; C = Centromérica, T = Telomérica, T* = Terminal, I = Intersticial.

Espécie	Localidades/Estados	2n ^a	Fórmula cariotípica	NF ^b	Heterocromatina	RONs	18S ^c	5S ^d	Referências
<i>B. aff. exodon</i>	Córrego Três Bocas (PR)	52	16m+12sm+6st+18a	86	-	2-5	8	-	Paintner-Marques, Giuliano-Caetano e Dias (2002a,b),
<i>B. aff. exodon</i>	Córrego Três Bocas (PR)	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	2-5	-	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Rio Água da Floresta (PR)	52	8m+22sm+10st+12a	92	C, T	2	2	-	Paintner-Marques, Giuliano-Caetano e Dias (2003)
<i>B. coeruleus</i> *	Rio Água da Floresta (PR)	52	12m+18sm+8st+14a	90	P, T	-	-	-	Portela-Castro <i>et al.</i> (2008)
<i>B. coeruleus</i> *	Rio Água da Floresta (PR)	52	8m+28sm+6st+10a	94	P, T	-	-	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Tatupeba (PR)	52	8m+20sm+8st+16a	88	-	2	2	-	Capistano, Portela-Castro e Júlio-Junior (2008)
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Maringá (PR)	52	12m+18sm+8st+14a	90	-	2-4	6	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Ribeirão Keller (PR)	52	8m+28sm+6st+10a	94	-	2-4	10	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	12m+16sm+10st+14a	90	-	3-5	-	-	Ebehardt <i>et al.</i> (2012)
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	14m+18sm+10st+10a	94	-	2	-	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	10m+24sm+6st+12a	92	-	2-3	-	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	10m+14sm+8st+20a	84	-	0	-	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	12m+10sm+16st+14a	90	P	2	2	-	Silva, Giuliano-Caetano, Dias (2014)
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	18m+14sm+10st+10a	94	P	2-4	2-6	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	20m+18sm+4st+10a	94	P	2-5	2-6	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	20m+14sm+12st+6a	98	P	2-3	4	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	22m+18sm+8st+4a	100	P	3-4	4-6	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Córrego Três Bocas (PR)	52	18m+24sm+6st+4a	100	P	3-5	4-6	-	
<i>B. coeruleus</i> *	Rio Ocoí (PR)	52	12m+18sm+8st+14a	90	P	2	2	-	Nishiyama <i>et al.</i> (2015)
<i>B. coeruleus</i>	Rio Piquiri (PR)	52	14m+20sm+8st+10a	94	P, T	4-5	6-9	10-11	Presente estudo

Espécie	Localidades/Estados	2n ^a	Fórmula cariotípica	NF ^b	Heterocromatina	RONs	18S ^c	5S ^d	Referências
<i>B. aff. iheringii</i>	Rio Ijuí (RS)	52	10m+16sm+14st+12a	92	P, T*	3	3	2-4	Presente estudo
<i>B. aff. iheringii</i>	Rio Iguaçu (PR)	52	10m+10sm+16st+16a	88	P, T*, I	2	2	2	Presente estudo
<i>B. cf. iheringii</i>	Afluente do Rio Corumbataí (SP)	52	10m+14sm+18st+10a	94	P	2	2	2	Piscor <i>et al.</i> (2013)
<i>B. ecai</i> - I	Rio Forquetinha (RS)	52	10m+10sm+8st+24a	80	P, T	2-4	4	-	Santos <i>et al.</i> (2012)
<i>B. ecai</i> - II	Rio Forquetinha (RS)	52	10m+18sm+8st+16a	88	P	2	2	-	
<i>B. ecai</i> - III	Rio Forquetinha (RS)	52+B	14m+14sm+6st+18a	86	P	2-3	6	-	
<i>B. ecai</i> - IV	Rio Forquetinha (RS)	52	10m+24sm+14st+4a	100	P, T, I	2	2	-	
<i>B. ecai</i> - V	Rio Forquetinha (RS)	52	8m+16sm+14st+14a	90	-	3	4	6	Santos <i>et al.</i> (2017)
<i>B. ecai</i> - VI	Rio Forquetinha (RS)	52	10m+16sm+8st+18a	86	-	3	13	8	
<i>B. ecai</i> - VI	Rio Forquetinha (RS)	52	8m+18sm+10st+16a	88	-	3	10	7	
<i>B. cf. ecai</i>	Riacho Bigua (SC)	52	10m+16sm+14st+12a	92	P, T*, I	2	4	4	Presente estudo
<i>B. cf. eigenmanni</i>	Riacho Bigua (SC)	52	6m+16sm+16st+14a	90	P, T*, I	2	4	5	Presente estudo
<i>B. turiuba</i>	Afluente do rio Passa-Cinco (SP)	52	8m+10sm+14st+20a	84	P	2	4	4	Piscor <i>et al.</i> (2013)
<i>B. sp.</i> - Grupo 1	Córrego Vermelho (PR)	52	16m+14sm+10st+12a	92	-	2	4	6	Santos <i>et al.</i> (2017)
<i>B. sp.</i> - Grupo 2	Córrego Vermelho (PR)	52	16m+14sm+10st+12a	92	-	5	16	8	
<i>B. sp.</i>	Rio Cambutá (PR)	52	2m+10sm+20st+20a	88	-	3	6	2	

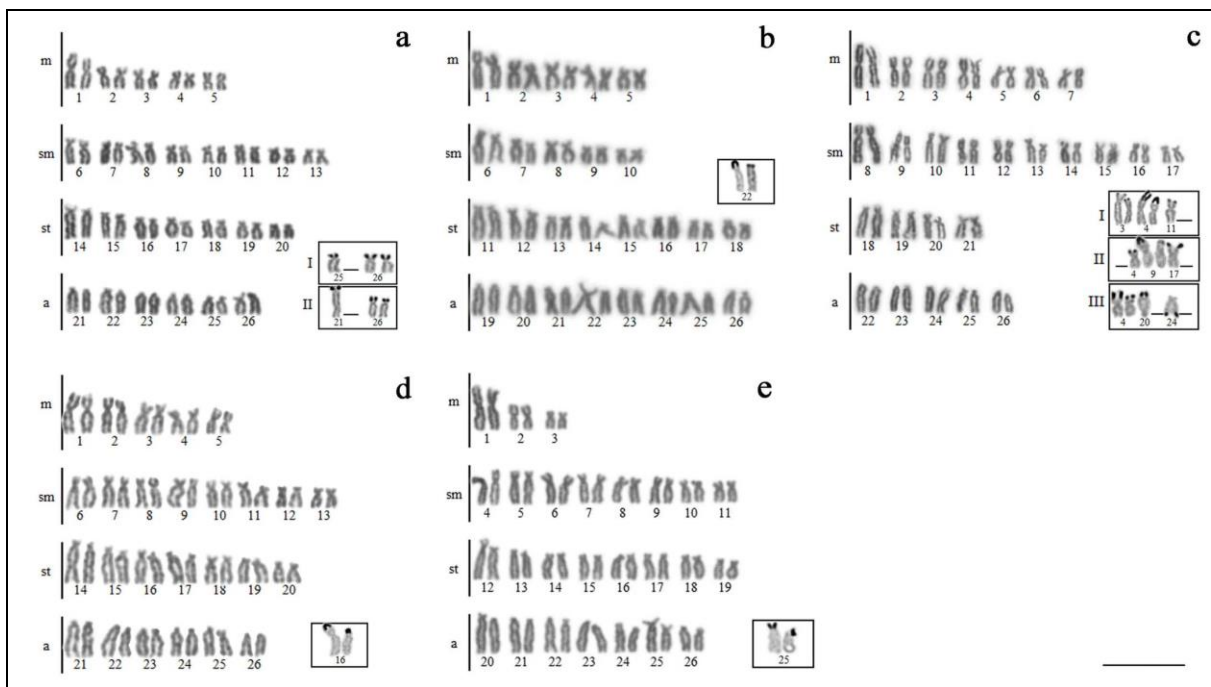


Fig. 1 Cariótipos de *Bryconamericus* corados com Giemsa. Em destaque, nas caixas, os cromossomos portadores das RONS: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) - caixa I: padrão I; caixa II: padrão II; **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* - caixa I: padrão I; caixa II: padrão II; caixa III: padrão III; **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 μm .

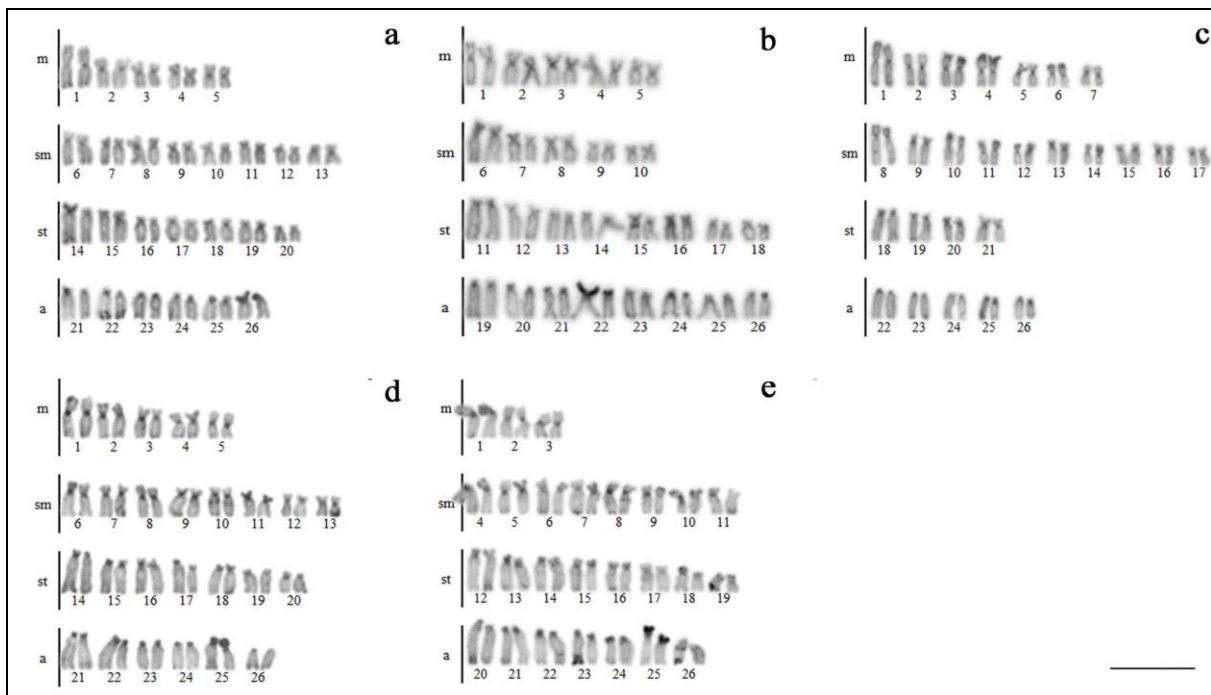


Fig. 2 Cariótipos de *Bryconamericus* C-bandados: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, padrão II); **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* (padrão II); **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 μm .

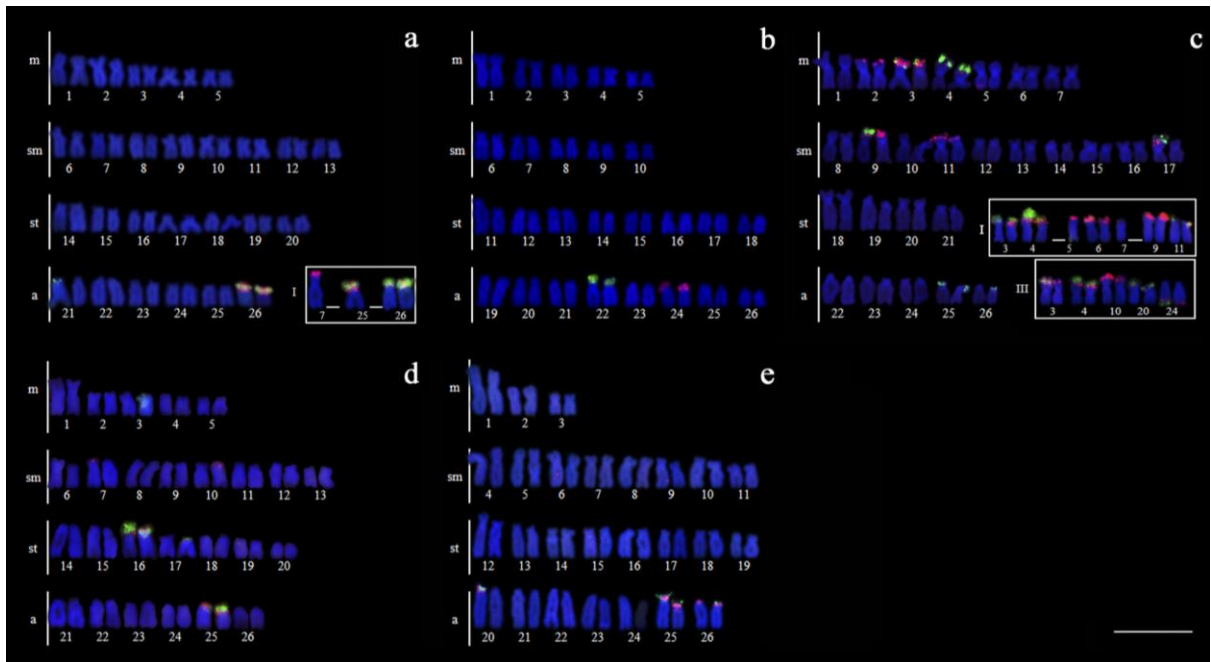


Fig. 3 Cariótipos de *Bryconamericus* após *double-FISH* com sondas de 18S rDNA (verde) e 5S rDNA (vermelho). Em destaque, nas caixas, as variações intrapopulacionais que representam padrões distintos de localização dos genes ribossomais: **a.** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí, padrão II) - caixa I: padrão I; **b.** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c.** *B. coeruleus* (padrão II) - caixa I: padrão I; caixa III: padrão III; **d.** *B. cf. ecai*; **e.** *B. cf. eigenmanni*. A barra representa 10 μm .

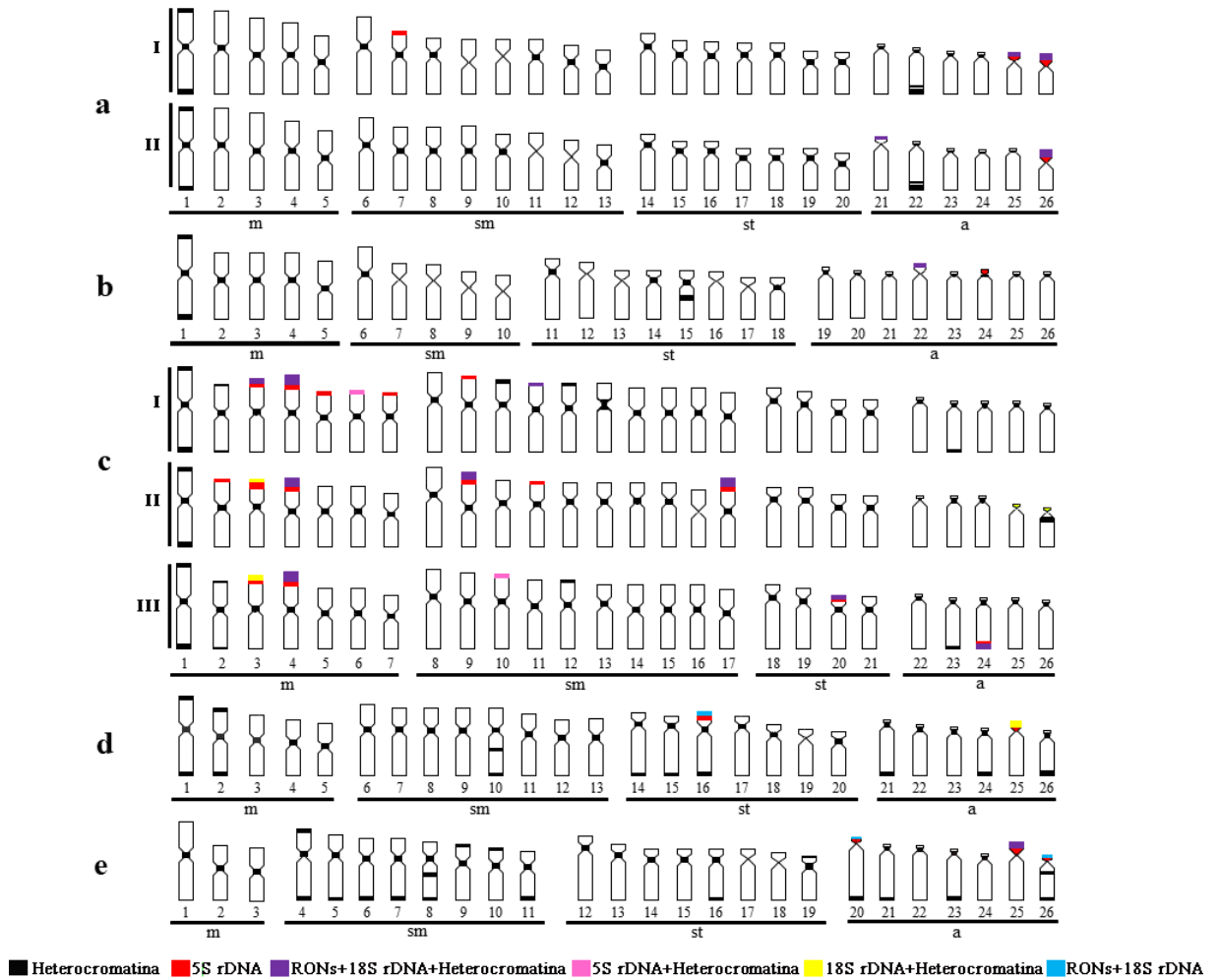


Fig. 4. Ideograma comparativo das características citogenéticas das quatro espécies de *Bryconamericus*: **a** *B. aff. iheringii* (rio Ijuí), padrões I e II; **b** *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu); **c** *B. coeruleus*, padrões I, II e II; **d** *B. cf. ecai*; **e** *B. cf. eigenmanni*.

ANEXO 1

Normas para publicação no periódico *Neotropical Ichthyology*

Submission of manuscripts:

All **Neotropical Ichthyology** submission system is exclusively online through the portal ScholarOne. Manuscripts must be submitted as digital files at <http://mc04.manuscriptcentral.com/ni-scielo>. The Editor-in-Chief will screen each manuscript submitted to **Neotropical Ichthyology** verifying whether it is within the journal's scope, presents original research and follows the instructions of the journal to authors. After passing through the initial screening, articles will be assigned to a Section Editor, who will assign an Associate Editor and start the single blind review process. The journal is open for submissions to all researchers on Neotropical ichthyofauna.

With each new *manuscript* submission, *authors* must include a **cover letter** stating that the article constitutes original research and is not being submitted to other journals. Your letter should also explain to editors why your article should be published, highlight the strengths of your research and outline the recommendations that can be drawn from your work. In multi-authored papers, the author responsible for submission must declare in the cover letter that all coauthors are aware of and agree with the submission. To that end, please ensure that all your coauthors have read and approved the final version.

The mailing addresses and valid e-mail addresses for all authors must be entered in the appropriate forms during manuscript submission. We strongly encourage you to register in <http://orcid.org/>, ask your coauthors to do the same and provide ORCID numbers for all authors during submission. At least the ORCID of the corresponding author is mandatory. Do not translate Institution names. During the submission, indicate at least five possible reviewers, providing name, institution, country, and valid e-mail addresses. You may also indicate your opposition to particular reviewers or conflicts of interests, if applicable.

Please, read carefully and follow all applicable rules prior to submission. Manuscripts that do not meet the journal formatting requirements, lack required files, or are written in poor English will be returned to authors without review.

Costs

Paper charges will be billed to the corresponding author upon initial distribution of page proofs with costs of R\$400 reais for articles of up to 20 printed pages, adding R\$5 reais for each page added. For authors from outside Brazil the values will be converted to US dollars based on the official quotation of the budget day.

All charges are waived when one or more authors are current SBI members (with the membership fee of the current year paid) or when the paper has been invited through the system. Contact the SBI Secretary (<http://www.sbi.bio.br/en/membership>) for membership rates and payment procedures.

Form and preparation of manuscripts:

General form and preparation of manuscripts

Do not duplicate information among the text, figures and tables. Submit only figures and tables that are strictly necessary. Supplementary files such as appendices, and videos should be uploaded already formatted, as pdf or video files. They will be available only in the online version.

For taxonomic papers, please also refer to: *Neotropical Ichthyology* taxonomic style below.

Licensing

Until 2015, *Neotropical Ichthyology* published under a Creative Commons BY-NC license (Attribution-Non commercial). In 2015 the journal changed to the more permissive Creative Common BY license (Attribution). Articles accepted for publication become property of the journal.

Formatting rules

Please, be sure you have carefully read all the items below

FILE AND PAGE SETUP Manuscript files must be in the DOC, DOCX or RTF formats. Do not lock or protect the file. Formats such as XLS, XLSX or PDF will NOT be accepted.

The document file cannot include headers, footers, or footnotes (except page number). If your manuscript, figures or tables contain footnotes, move the information into the main text, captions or the reference list, depending on the content. Do not format text in multiple columns. Although no page limit is imposed, manuscripts should always be as concise as possible.

Text should be aligned to the left (except if otherwise mentioned), not fully justified, not indented by tab or space and not underlined. Do not hyphenate words at line breaks (though hyphens can be used in compound constructions, such as dorsal-fin rays, as appropriate).

All text must be Times New Roman font size 12, with 1.5 line spacing. Do not number lines. The font “symbol” can be used to represent the following characters: χ μ θ ω ε ρ τ Ψ υ ι π α σ δ Φ γ η φ κ λ Ξ ϖ β ν \cong Θ Ω Σ Δ Φ . Spell out numbers from one to nine, except those that refer to numerical values, scale counts, and when referencing figures and tables. Also, spell out numbers that begin a sentence.

Abbreviations used in the text must be listed under Material and Methods; except for those in common use (e.g., min, km, mm, kg, m, sec, h, ml, L, g). For measurements, use the metric system. Never use n- or m-dashes anywhere in the manuscript; always use hyphens instead.

LANGUAGE Text must be submitted in English. If none of the authors are native English speakers, we recommend that you contract with a professional language-editing and copyediting services or have the manuscript read by a native English speaking colleague prior to submission. Authors are free to choose any certified service, but *Neotropical Ichthyology* authors receive a discount from these two companies.

Avoid clichés, slang, and colloquial words or expressions such as “In the present study”. Use the word “very” sparingly.

TITLE New taxa names should not appear in the title or abstract. *E.g.*, this title meets the guidelines: A new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes).

Center the title and present it in boldface, without quotation marks, with sentence-style capitalization, and with subordinate taxa separated by “:” *e.g.*, ...**(Siluriformes: Loricariidae)**. Titles must reflect the contents of the paper and use scientific names rather than vernacular names. Do not provide taxonomic authorship in the title, but do provide it in the first appearance of the name in the text. See Nomenclature Section below for further instructions.

AUTHORS As the submitting author will be responsible for completing information at submission, it is mandatory that all authors have reviewed, discussed, and agreed with the contents of the manuscript and the order of authorship prior to submission. All co-authors must have contributed substantially to all article steps. Collectors and contributors of resources and equipment without substantial intellectual involvement in the project should be mentioned in the Acknowledgments, but not included as authors.

Capitalize only the initial letters of authors’ names. Do not abbreviate first name of authors and separate the names of the last two authors by “and”. We encourage presenting the full middle names of the authors, except when the number of authors is more than four. In case of authors from different institutions, use superscript numerals to identify each one in regular font (not italics). Superscript numerals can also be used to identify multiple addresses for each individual author. For Hispanic surnames, insert a hyphen between the paternal and the maternal surname if the author wishes to be cited with both (*e.g.*, Javier Maldonado-Ocampo).

AUTHORS ADDRESSES Full mailing addresses and email of all authors must be provided, including institution name, ZIP codes, cities (no comma between ZIP and city), states and countries. For Brazilian and American states, use standard abbreviations preceded by comma, and always present the country name in English. Footnotes should not be used. List emails as part of the institutional address. When there is more than one author at a given institution, insert initials of each author name before their respective email address. Indicate the corresponding author by adding (corresponding author) after the appropriate email address. Do not use period.

E.g., Heraldo A. Britski¹, Naércio A. de Menezes¹, Javier Maldonado-Ocampo² and John Lundberg³

¹ Seção de Peixes, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Av. Nazaré, 481, Ipiranga, 04263-000 São Paulo, SP, Brazil. (HAB) heraldo@usp.br (corresponding author), (NAM) naercio@usp.br

²Unidad de Ecología y Sistemática (UNESIS), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Edf. 53, Laboratorio de Ictiología 108B, Carrera 7 No. 43-82, Bogotá, DC, Colombia. gymnopez@gmail.com

³Department of Ichthyology, The Academy of Natural Sciences of Drexel University, 1900 Benjamin Franklin Parkway, 19103-1195 Philadelphia, PA, USA. lundberg@ansp.org

RUNNING HEAD Provide a suggested running head of up to 50 characters. It must concisely reflect the content of the article. Do not include vernacular names or species authorship here.

ABSTRACT Abstracts must appear as a single paragraph with fewer than 200 words in English. Do not include new taxa names, authorship or references. Do not indent. Remember that this is the first piece of your article that will be viewed by each potential reader. Include information showing the importance and relevance of your article to encourage the reader to read your entire paper.

RESUMO or RESUMEN Provide a concise (maximum 200 words) and accurate Portuguese or Spanish translation of the English abstract.

KEYWORDS Provide up to five capitalized keywords in English, in alphabetic order and separated by commas. Do not use words already contained in the title, nor Neotropical (which appears in the name of the journal). If the article provides an identification key, include that as keyword in the English and translated lists. The order of the Palavras-chave or the Palabras clave also is arranged alphabetically, but the sequence of the words might differ from those in English.

TEXT The body of text may employ named heading and subheadings, which cannot be lettered or numbered. All sections are left justified, except the primary headings, which should appear centered in small caps and bold font. Employ the following heading, in the cited order: **Title** (do not include the word Title before the title proper); **Abstract** (in English); **Resumo** or **Resumen** (choose only one, in Portuguese or Spanish); **Keywords** (in English and in the same language of the Resumo or Resumen you provided, literally translated from the English); **Running Head; Introduction; Material and Methods; Results; Discussion; Acknowledgments** (optional); and **References**. Do not unite Results and Discussion as a unique section or provide a separate Conclusion section. However, we encourage highlighting conclusions as the last paragraph(s) of the Discussion. If two heading levels are used, follow this format:

Material and Methods

Sampling sites. Collections were carried out in...

Statistical analyses. Data were analyzed...

In case of listing Examined Material, provide a list of institutional acronyms in Material and Methods section OR a reference to a published paper with a list of acronyms in Material and Methods. Also, reference(s) for species identification and classification used must be provided.

VOUCHER SPECIMENS Voucher specimens of all species examined must be deposited in a recognized scientific research collection, even in studies focusing on a single well-known species. A list of catalog numbers of voucher specimen(s) must be furnished in all manuscripts.

NOMENCLATURE Species, genera, and Latin terms (*et al.*, *in vitro*, *in vivo*, *vs.*, *i.e.*, *e.g.*) must be in italics. Cite scientific names according to the ICZN (<http://iczn.org/iczn/index.jsp>).

Authorship should be given at the first reference to a species or genus. Spelling, valid names and authorship of species must be checked in the Catalog of Fishes at <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Latin terms presented between the generic and specific names (cf., aff., etc.) are not in italics (*e.g.*, *Hoplias cf. malabaricus*).

The genus name must always be fully spelled at its first appearance, at the beginning of a sentence and at least once in each figure and table caption(s). After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (*e.g.*, *H. malabaricus*) as long as the abbreviation leaves no possibility of confusion with another generic name mentioned in the manuscript. In the case of possible confusion, the abbreviation can include more than the first letter to allow the differentiation of genera beginning with the same letter.

ACKNOWLEDGMENTS Acknowledgments are optional but encouraged. If included, they must be concise and include both first and last names of persons. Abbreviate institutions, where the full name has been provided in the Material and Methods. Names of sponsor institutions should be listed in their original spelling and not translated to English. Collections permit numbers and approvals of ethics committees can be listed here OR in the Material and Methods section.

TABLES Tables must be numbered sequentially in Arabic numerals according to the order of citation in the text and be cited in the text using the following formats: Tab. 1, Tabs. 1-2, Tabs. 1, 4. Approximate locations where tables should be inserted must be indicated in upper case, along the right margin of the text, as in:

TABLE 1

In table captions, the word Tab., its respective number and final period after the number should be in bold (*e.g.*, **Tab. 1...**). End the caption in a period. Captions must be self-explicative. If genus names appear in a caption, spell out the name at least once.

Tables must be constructed in cells using lines and columns. Do not format tables with “tab” or “space”. Tables should not contain visible vertical lines or footnotes [contents of footnotes must be included in the caption].

List all captions at the end of the manuscript, in the following format: *e.g.*, **Tab. 1.** Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma pyrrhopteryx* and *D. speculiferum*...

FIGURES Figures must be numbered sequentially in Arabic numerals according to their order of citation in the text. Cite figures in the text using the following formats: Fig. 1, Figs. 1-2, Fig. 1a, Figs. 1a-b, Figs. 1a, c. Indicate the approximate locations where figures should be inserted in upper case, along the right margin of the text, as in:

FIGURE 1 In each figure caption, the word Fig., its respective number and period are in bold (*e.g.*, **Fig. 1...**). End each caption with a period. Captions must be self-explicative. If genus names appear in a caption, spell out the name at least once. Do not include symbols in the caption, but rather replace them with text (*e.g.*, black triangle) or include a legend in the figure itself.

Indicate figure subsections in lower case and bold letters in both in the figure and caption (*e.g.*, **Fig. 1.** Olfactory epithelium of representatives of Otophysi. **a.** *Cyprinus carpio*; **b.** *Brycon orbignyanus*; **c.** *Pimelodus maculatus*;

and **d.** *Sternopygus macrurus*. Scale bars = 1 mm). Do not use capital letters, or parentheses after letters.

Cite figures from other articles using the same formats as figures published in the present article, but do not capitalize them (*e.g.*, ...according to the figs. 2b of Vari, Harold (2001)...).

Figures cannot be submitted as images inserted in Word files. Figures must be submitted as high quality individual files. For b&w figures, they must be saved in TIFF format, gray scale, 8.5 or 17.5 cm width, 600 dpi. Color figures must be in TIFF format, CMYK, 8.5 or 17.5 cm width and 300 dpi.

Composed figures must fit either the page (17.5 cm) or column width (8.5 cm). Text included in graphs and pictures must have a font size compatible with reductions to page or column width.

Illustrations must include either a scale or reference to the size of the item in the figure caption.

List all captions at the end of the manuscript, in the following format: *e.g.*, **Fig. 1.** Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma pyrrhopteryx* and *D. speculiferum*...

SUPPLEMENTARY FILES Upload appendices, videos, datasets and other complementary materials as supplementary files. Identify these in the text by a bolded letter **S** followed by sequential numbers in Arabic numerals. Indicate in the text that those will appear only in the online version (*e.g.* ... as shown in the video **S1**, available only in the online version,...). List all captions at the end of the manuscript, in the following format: **S1.** Video of variation of tides...

PERSONAL COMMUNICATION Personal communication should be included in the text of your document – cited in text only and not be included in your reference list. *It is recommended you get permission from the source/author of your personal communication.*

Personal communication in the text of your document must include:

Date of communication; Type of communication – oral, written (*e.g.*, letter, written communication) or email (include email address); Affiliation (university, organization) and highest academic degree are optional.

E.g., Conversation: In a conversation with C. A. Silva (April 2010)...

Letter: According to a letter by C. A. Silva (Assoc. Prof., Dept of Biology, Universidade de São Paulo, SP) in November 2016... **OR** According to C. A. Silva, PhD (written communication, November 2016)...

E-mail: In-text: In an email from E. Anderson, PhD (e.anderson@usp.br) in August 2016...

REFERENCES References must be cited in the following formats in the text: Eigenmann (1915, 1921) or (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948) or Eigenmann, Norris (1918) or, for more than two coauthors, Eigenmann *et al.* (1910a, 1910b), always in chronological order after alphabetical order in case of more than one author cited.

Do not include undergraduate monographs, conference papers, abstracts or technical reports. Include Masters Thesis or Ph.D. dissertations only if extremely necessary. Do not format references with “tab” or “space” and present references in rigorous alphabetical order. In case

of authors with surnames with prepositions, in Portuguese do not include the preposition (*e.g.*, Carlos Alberto da Silva = Silva CA). In Spanish do not include “de” (*e.g.*, María de Rueda = Rueda M), but include “Del” (*e.g.*, Angel Del Río = Del Río A). Ignore prepositions for the purpose of alphabetization, as in the following example:

E.g. of sequence De Carli F
 Devincenzi GJ
 Eigenmann CH
 Maldonado-Ocampo J
 De Pinna MCC
 Del Río A
 Rueda M
 Silva CA

Note: In case of self-citations using a convention other than those exemplified, please cite using your usual convention and, in the cover letter, mention your intention to maintain and standardize that usage in all your self-citations in this and other journals.

Ensure that all citations in the text and the References coincide before submitting a manuscript. Use the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below.

Book Author(s) – Family name and initials, Multiple authors separated by a comma. Title of book. Edition of book if later than 1st ed. Place of Publication: Publisher Name; Year of Publication.

One author

Bailey KD. Methods of social research. 4th ed. New York: Free Press; 1994.

Nelson JS. Fishes of the world. 4th ed. Hoboken (NJ): J. Wiley; 2006.

Two to six authors

Borcard D, Gillet F, Legendre P. Numerical ecology with R. New York: Springer; 2011.

Graça WJ, Pavanelli CS. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: Eduem; 2007.

Pillar VP, Müller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA. Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; 2012.

Six or more authors

Baumgartner G, Pavanelli CS, Baumgartner D, Bifi AG, Debona T, Frana VA. Peixes do baixo rio Iguaçu. Maringá: Eduem; 2012.

Maldonado-Ocampo JA, Oviedo JSU, Villa-Navarro FA, Ortega-Lara A, Prada-Pedrerros S, Jiménez LF, Jaramillo-Villa U, Arango A, Rivas TS, Garcés GCS. Peces dulceacuícolas del Chocó biogeográfico de Colombia. Bogotá (DC): WWF Colombia, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Universidad del Tolima, Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca; 2012

OR

Maldonado-Ocampo JA, Oviedo JSU, Villa-Navarro FA, Ortega-Lara A, Prada-Pedrerros S, Jiménez LF et al. Peces dulceacuícolas del Chocó biogeográfico de Colombia. Bogotá (DC): WWF Colombia, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Universidad del Tolima, Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca; 2012.

Different Editions

Zar JH. Biostatistical analysis. 5th ed. Upper Saddle River (NJ): Prentice Hall; 2010.

Edited book

Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs; 1998.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, Jr., organizers. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003.

Book in a series

Fink WL, Weitzman SH. The so-called Cheirodontin fishes of Central America with descriptions of two new species (Pisces: Characidae). Washington (DC): Smithsonian Institution Press; 1974. (Smithsonian contributions to Zoology; No. 172).

Legendre P, Legendre L. Numerical ecology. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 1998. (Developments in environmental modeling; 20).

Meek SE. The fresh-water fishes of Mexico north of the isthmus of Tehuantepec. Chicago: Field Columbian Museum; 1904. (Field Columbian Museum. Publication, Zoological series; vol 5).

Wootton RJ. Ecology of teleost fishes. London: Chapman & Hall; 1990. (Fish and fisheries series; 1).

Electronic book - from a full text database

Eschmeyer WN, Fong JD. Species by family/ subfamily in the Catalog of Fishes. [Electronic version]. San Francisco (CA): California Academy of Sciences; 2017. [cited 2017 Oct 29]. Available from:

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> (NOTE HYPERLINKS HAVE NO PERIOD).

Froese R, Pauly D, editors. FishBase. [World Wide Web electronic publication]. Penang (MA), Rome: FAO; 2017 [cited 2017 Oct 29]. Available from: <http://fisbase.org>

Stoddard, WO. Among the lakes. [eBook]. New York: C. Scribner's Sons; 1890 [cited 2017 Oct 29]. Available from: <https://archive.org/stream/amonglakes00stod#page/n7/mode/2up>

Translation of a book

Lowe-McConnell RH. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Vazzoler AEAM, Agostinho AA, Cunningham PTM, tradutores. São Paulo: Edusp; 1999. (Coleção Base). Original title: Ecological studies in tropical fish communities.

Chapter in an edited book

Britto MR. Família Callichthyidae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS, editores. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional; 2007. p. 75-81. (Série Livros; 23).

Campos-da-Paz R, Albert JS. The gymnotiform “eels” of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p.401-417. (NOTE ALL DIGITS ARE PROVIDE IN PAGE NUMBERS OF BOOK CHAPTERS).

Reis RE. Family Callichthyidae (Armored catfishes). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, Jr., organizers. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p.291-309.

Chapter in a book

Gerking SD. Feeding ecology of fish. London: Academic Press; 1994. Chapter 3, Feeding variability; p.41-53.

Chapter from an electronic book

Darwin C. On the origin of species by means of natural selection or the preservation of

favoured races in the struggle for life [Internet]. London: John Murray; 1859. Chapter 5, Laws of variation. [cited 2010 Apr 22]. Available from:
<http://www.talkorigins.org/faqs/origin/chapter5.html>

Journal Articles Author(s) – Family name and initials. Title of article. Title of journal. – Abbreviated Publication year, month, day (month & day only if available); volume(issue):pages.

Note: Journal titles may be abbreviated according to the style used in the sites:
<http://cassi.cas.org/search.jsp>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>,
http://images.webofknowledge.com/WOK46/help/WOS/A_abrvjt.html. **In case you do not find the journal name in the above links, provide the full name of the journal and highlight it in yellow.**

Standard journal article – one author

Winemiller KO. Spatial and temporal variation in tropical fish trophic networks. *Ecol Monogr.* 1990; 60(3):331-67. (NOTE YOU MUST PRESENT ONLY TWO DIGITS FOR LAST PAGES IF THE PREVIOUS DIGITS COINCIDE WITH THE PREVIOUS DIGITS OF THE FIRST PAGE).

Standard journal article – two authors

Abudayah WH, Mathis A. Predator recognition learning in rainbow darters *Etheostoma caeruleum*: specific learning and neophobia. *J Fish Biol.* 2016; 89(3):1612-23.
 Winemiller KO, Jepsen DB. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. *J Fish Biol.* 1998; 53(Suppl.A):267-96.

Standard journal article – three to six authors

Morris MR, Batra P, Ryan MJ. Male-male competition and access to females in the swordtail *Xiphophorus nigrensis*. *Copeia.* 1992; (4):980-86.
 Vari RP, Ferraris CJ, Jr., De Pinna MCC. The Neotropical whale catfishes (Siluriformes: Cetopsidae: Cetopsinae), a revisionary study. *Neotrop Ichthyol.* 2005; 3(2):127-238.

Journal article – more than six authors

Xavier JHA, Cordeiro CAMM, Tenório GD, Diniz AF, Paulo Júnior EPN, Rosa RS, Rosa IL. Fish assemblage of the Mamanguape Environmental Protection Area, NE Brazil: abundance, composition and microhabitat availability along the mangrove-reef gradient. *Neotrop Ichthyol.* 2012; 10(1):109-22.

OR

Xavier JHA, Cordeiro CAMM, Tenório GD, Diniz AF, Paulo Júnior EPN, Rosa RS et al. Fish assemblage of the Mamanguape Environmental Protection Area, NE Brazil: abundance, composition and microhabitat availability along the mangrove-reef gradient. *Neotrop Ichthyol.* 2012; 10(1):109-22.

Journal article – in press

Melo MRS, Buckup PA, Oyakawa OT. A new species of *Characidium* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Crenuchidae) endemic to the Atlantic Forest in Paraná State, southern Brazil. *Neotrop Ichthyol.* Forthcoming 2016.

Note 1: Cite only if the paper is about to be published. If your article is accepted, be sure to provide full details of the article already published in the proofs.

Note 2: You can include date, volume and issue number if provided.

Electronic journal article – with DOI number

Pessanha ALM, Araújo FG. Spatial and size feeding niche partitioning of the rhomboid mojarra *Diapterus rhombeus* (Cuvier, 1829) in a tropical Brazilian Bay. *Mar Biol Res* [serial on the Internet]. 2012; 8(3):273-83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2011.615326>

Electronic journal article – without DOI number

Koike Y, Koya Y. Viable periods of fertilizability of eggs and sperm of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Japan. J. Ichthyol [serial on the Internet]. 2014; 61(1):9-14. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jji/61/1/61_9/_pdf

Journal article from a full text database

Fletcher D, Wagstaff CRD. Organizational psychology in elite sport: its emergence, applications and future. Psychol Sport Exerc [serial on the Internet]. 2009; 10(4):427-34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/>

Reports and other Government Publications Author(s). Title of report. Place of publication: Publisher; Date of publication – year month if applicable.

Government /Organisation /Scientific /Technical report

International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). International Code of Zoological Nomenclature. 4th ed. London: International Trust for Zoological Nomenclature Natural History Museum; 1999.

International Union for Conservation of Nature (IUCN). Standards and Petitions Subcommittee. Guidelines for using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 13 [Internet]. 2017 [updated 2017 Mar]. Available from: <http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/RedListGuidelines.pdf>

Thesis Printed Thesis: Author. Thesis title [type of thesis]. Place of publication: Publisher; Year.

Online Thesis: Author. Thesis title [type of thesis on the internet]. Place of publication: Publisher; Year [cited date – year month day]. Available from: Name of database. web address

Thesis

Langeani Neto F. Estudo filogenético e revisão taxonômica da família Hemiodontidae Boulenger, 1904 (sensu Roberts, 1974) (Ostariophysi, Characiformes). [PhD Thesis]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 1996.

Thesis – retrieved from fulltext database/internet

Bifi AG. Revisão taxonômica das espécies do grupo *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) da bacia do rio da Prata. [PhD Thesis on the Internet]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2013 [cited 2010 Mar 24]. Available from: Biblioteca digital Universidade Estadual de Maringá. HTTP://<http://nou-rau.uem.br/nou-rau/document/?code=vtls000205331>

Vaz GDA. Estudo da ecomorfologia comparada de Pantodontidae (Teleostei: Osteoglossiformes) e Gasteropelecidade (Teleostei: Characiformes). [MSc Dissertation on the Internet]. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; 2016 [cited 2016 Oct 29]. Available from: Biblioteca digital Universidade de São Paulo. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59139/tde-29072016-091155/pt-br.php>

Webpages Author. Title of publication [type of medium – Internet]. Place of publication (if available): Publisher (if available); Date of publication – year month day (supply year if month and day not available) [updated year month day; cited year month day]. Available from: web address

Web page – with author

Eschmeyer WN, Fricke R, van der Laan R, editors. Catalog of fishes: genera, species, references [Internet]. San Francisco: California Academy of Science; 2016 [updated 2016 Sep 29; cited 2016 Oct 15]. Available

from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

Web Article with DOI

Frota A, Deprá GC, Petenucci LM, Graça WJ. Inventory of the fish fauna from Ivaí River basin, Paraná State, Brazil. *Biota Neotropica* [serial on the Internet]. 2016 Jun 27 [cited 2016 Jun 06]; 16(3):e20150151. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/bn/v16n3/1676-0611-bn-1676-0611-BN-2015-0151.pdf> DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2015-0151>

Image or map on a webpage

IBGE. Maringá-PR [Image on the internet]. 2010 [cited 2016 Sep 12]; Available from: ftp://geoftp.ibge.gov.br/cartas_e_mapas/mapas_para_fins_de_levantamentos_estatisticos/censo_demografico_2010/mapas_municipais_estatisticos/pr/maringa_v2.pdf

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Computer software manual - Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Available from: <https://www.r-project.org/>

StatSoft, Inc. STATISTICA [Data Analysis Software System], version 10. Available from: www.statsoft.com

Taxonomic style instructions

This summary provides information specific to taxonomic manuscripts. For large taxonomic revisions and reviews, see additional recommendations below. Items with * are required, others are recommended whenever applicable.

Taxon accounts should be in alphabetical order. For original descriptions, the words “**new genus**” or “**new species**” should appear after the name of the new genus or species, preceded by a comma. The designation also must appear in the caption of the holotype’s figure, in the case of a new species. For species mentioned in the Diagnosis section but for which no comparative material was examined, please formally cite their original descriptions and provide the full references.

Note: Prior to submitting a description of a new taxon, please register new nomenclatural act(s) and the paper (as unpublished manuscript) at URL: <http://zoobank.org/> and provide the nomenclatural act code just below the new taxon name (e.g., urn:lsid:zoobank.org:act:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-9XXX0XX99X12. After publication, please update the ZooBank article status from unpublished to published. This must be done by the author who made the initial registration

Generic accounts

***Genus* Author, year (or new genus - do not abbreviate) (bolded and centered)**

urn:lsid:zoobank.org:act:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-9XXX0XX99X12 (in case of new genus only)
(centered)

Synonymy.

Type species.*

Diagnosis.*

Description.***Etymology.** for new genus only***Remarks.****Key to species.**

Comments on above:

Synonymy Provide a complete synonymy listing all validly published names that have been applied to the genus, including all references in systematic treatments or identification guides that can help link the present concept of the genus to past concepts. The senior synonym is usually the correct and valid name. If applicable, include invalid names and mistakes in identity with suitable annotation to indicate their nature. For each name listed, include minimally: the original form of the name; the author and date of publication; reference and page number; basic information on the genus in the paper cited (modified from Wiley EO, Lieberman BS. *Phylogenetics: theory and practice of Phylogenetic Systematics*. 2nd edition. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2011). Provide full references of all listed sources as part of the References section. If applicable, discuss the synonymy and cite relevant literature in the Remarks section.

E.g., *Parodon Valenciennes*, 1849

Parodon Valenciennes, in Cuvier, *Valenciennes*, 1849:50 (original description; type-species by original designation and monotypy: *Parodon suborbitalis Valenciennes*). –Günther, 1864:31 (redescription). –Eigenmann, 1912:274 (diagnosis). –Schultz, Miles, 1943:251 (diagnosis in key). –Schultz, 1944:288 (diagnosis in key). –Campos, 1945:440 (diagnosis). –Miles, 1947:132 (diagnosis). –Travassos, 1955:4 (synonymic list). –Böhlke, 1958:83 (comments). –Ringuelet et al., 1967:180 (diagnosis in key). –Roberts, 1974b:433 (osteology). –Godoy, 1975:451 (diagnosis in key). –Géry, 1977:202 (diagnosis in key). –Britski et al., 1988:26 (diagnosis in key).
Nematoparodon Fowler, 1943:226 (original description; type-species by original designation and monotypy: *Parodon apolinari* Myers).

Type-species For proposed new genera, the original name of the proposed type-species, followed by author and year of publication (or new species) is sufficient. For previously proposed generic names, the following additional information is required (in this order): Nature of type designation (e. g., original designation, monotypy, absolute tautonymy, etc). Whether the type-species was not designated in the original publication, the author, year and page of the subsequent designation should be cited (e. g., Type by subsequent designation by Jordan, 1919: 45).

Diagnosis Diagnosis should NOT be written in telegraphic style (for purposes of clarity). A generic diagnosis should preferably list the unique synapomorphies of the genus, followed by homoplastic derived characters and/or other useful distinguishing characteristics.

Description In telegraphic style (i.e., no verbs nor articles).

Etymology For new names, state the gender, even though it may be obvious from the construction. Do not give an etymology for preexisting names. If it is necessary to discuss the etymology of an old name (for example, to justify an interpretation of its gender), include that in the Remarks section.

Key to species If a key for identification of species is provided and it was not mentioned in the title, add “dichotomous key” or “identification key” as a keyword.

Specific accounts

Order of presentation:

***Species* Author, Year (or new species - do not abbreviate) (bolded and centered)**

urn:lsid:zoobank.org:act:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-9XXX0XX99X12 (in case of new species only)
(centered)

Synonymy.

Holotype.* for new species only - include full collection data (see details, below)

Paratype(s). for new species only - include full collection data (see details, below)

Non-types. for new species only - include reduced collection data (see details, below)
(Justification for separating non-types from types should be provided in the Material and Methods section)

Diagnosis.* see below for instruction on how to prepare a species diagnosis

Description.*

Coloration in alcohol.*

Coloration in life.

Sexual dimorphism.

Geographical distribution.*

Ecological notes.

Etymology. for new species only*

Conservation status.

Remarks.

Material examined. for accounts of previously named species

Comments on the above:

Synonymy Provide a complete synonymy listing all validly published names that have been applied to the species, including all references in systematic treatments or identification guides that can help link the present concept of the species to past concepts. The senior synonym is usually the correct and valid name. If applicable, include invalid names and mistakes in identity with suitable annotation to indicate their nature. For each name listed, include minimally: the original form of the name; the author and date of publication; reference and page number; country or basin and basic information on the species in the paper cited (modified from Wiley EO, Lieberman BS. *Phylogenetics: theory and practice of Phylogenetic Systematics*. 2nd edition. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2011). Provide full references of all listed sources as part of the References section. If applicable, discuss the synonymy and cite relevant literature in the Remarks section.

E.g., *Parodon caliensis* Boulenger, 1895

Parodon caliensis Boulenger, 1895:480 (original description; type-locality: near Cali, Colombia). –Eigenmann, 1922(reprint 1976):109 (*partim*; Paila, río Cauca basin; diagnosis in key). –Miles, 1943:47 (río Cauca; redescription). –Miles, 1947:132 (río Magdalena;

meristics). –Roberts, 1974b:416 (osteology; osteological illustrations). –Roberts, 1975:269 (dentition).

Parodon saliensis [sic]. –Roberts, 1975:269 (dentition).

Parodon Parodon caliensis. –Géry, 1977:203 (diagnosis in key).

Types For new species, list types separately from other comparative material examined. Include full collection data, in the following order:

Museum acronym and catalog number, number of specimens (except for holotype), size range separated by hyphen, number and size range of measured specimens, if different (in parentheses along with size range) locality (country, state, municipality, locality, basin, coordinates), date of collection [in dd, Month (3 letter abbreviation) and yyyy], and collector(s) [e.g., Paratypes. LIRP 5640, 25, 38.5-90.3 mm SL (12, 75.0-90.3 mm SL), Brazil, São Paulo, Município de Marapoama, rio Tietê basin, ribeirão Cubatão at road between Marapoama and Elisiário, 21°11'35"S 49°07'22"W, 10 Feb 2003, A. L. A. Melo].

Group paratypes by country or basin, in alphanumeric order of museum acronym and catalog numbers inside each group.

Note: Except in cases where no actively-curated scientific research collection exists, Holotypes must be deposited in collections in the country of origin of the species. When a species occurs in multiple countries, the holotype must be deposited in the country of the type-locality, with paratypes distributed among countries in which the species occurs. Even in cases of species endemic to one country, we encourage dissemination of paratypes.

Diagnosis Do NOT write the diagnosis in telegraphic style (for purposes of clarity). A species diagnosis is typically a paragraph constructed of full sentences that list the most important traits that allow the reader to unequivocally identify the species. Ideally, the diagnosis includes one or more features that are unique to the species, preferably autapomorphic characters. If unique features were not discovered, the next best option is a differential diagnosis, within which a series of direct comparisons are made among species and the alternative character states specified by contrasts are stated explicitly (using "vs." followed by the condition found in the species, or group of species, being compared, for each diagnostic feature). Diagnoses that consist only of a combination of characters (*i.e.*, traits listed sequentially which, when considered together, distinguish the species from congeners) in many cases fail to make a convincing case that the species warrants recognition, mostly because too little information is offered in the way of direct comparisons with congeners. They also make it very difficult for readers not already expert in the systematics of the group in question to recognize the new species. For that reason, this form of diagnosis should be avoided. In the event of listing species in the diagnosis without associated comparative material, please formally cite their original descriptions and provide full references.

Description Write the description section in telegraphic style (*i.e.*, without verbs and articles). Treat bilaterally paired structures in the singular (*e.g.*, pelvic fin short, not pelvic fins short). Compound adjectives that include a noun should be connected by a hyphen (*e.g.*, pectoral-fin spine, NOT pectoral fin spine). Fin-ray formulae should be reported with unbranched rays in lower case Roman numerals, spines in upper case Roman, and branched rays in Arabic numerals. Transitions between different types of rays should be indicated by a comma (,) and not a plus sign (+), or dash (-) (*e.g.*, iii,7 or II,9. Not iii-7 or iii+7; no spaces should be inserted after the comma). We treat the catfish spinelet as a spine, so dorsal fin counts that include a spinelet should be reported as II,6 (or whatever the branched ray count

is).

Do not include space between numerals and % (*e.g.*, 25%, not 25 %).

Coloration Write this section in telegraphic style (*i.e.*, without verbs or articles). This section may be divided into Coloration in alcohol and Coloration in life.

Geographic distribution Geographic descriptors must NOT be translated and should be capitalized or not according to the standard usage in the language in question. English usage typically uses capitals (*e.g.*, Amazon River, Parana River, Paraguay River) while Portuguese and Spanish do not (*e.g.*, rio Solimões, río Magdalena, rio Paraná, río Parana, río Paraguay, rio Paraguai). When referring to a municipality or geopolitical region that includes the names of a water body, capitalize the entity as a proper noun in all languages (*e.g.*, Municipality of Arroio dos Ratos, State of Rio Grande do Sul).

Etymology For new names, state the usage (adjective, noun, patronym, etc.), even though it may be obvious from the construction. For more information, see article 31 of the online International Code of Zoological Nomenclature (<http://www.iczn.org/iczn/index.jsp>). Do not provide an etymology for preexisting names, unless the etymology is necessary to justify the spelling. In such cases, include this information in the Remarks Section and not as a separate heading.

Conservation status Please consider providing the conservation status, at least for new species, based on the IUCN criteria and categories [*e.g.*, **Conservation status**. According to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) categories and criteria (IUCN Standards and Petitions Subcommittee, 2016), *Genus species* can be classified as Category (category abbreviation)]. In such case, the reference to be provided is: International Union for Conservation of Nature (IUCN). Standards and Petitions Subcommittee. Guidelines for using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 12 [Internet]. 2016 [updated 2016 Feb]. Available from: <http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/RedListGuidelines.pdf>

Material examined Provide only taxa, museum acronym, catalog number, number of specimens and size range.

Indicate any types by: (Holo- Syn-, etc.) type of *Genus species* Author, date. For lectotypes or neotypes, also cite the source of designation (*e.g.*, USNM 123456, lectotype of *Genus species* Author, date, designated by Author (year: pp) [or designated herein]).

Specimen lots should be arranged taxonomically, and then by country or basin (in bold), in alphanumeric order of museum acronym and catalog numbers inside each group proposed (*e.g.*, *Auchenipterichthys coracoideus*: **Peru**: CAS 220574, 2, 104.0-107.0 mm SL, syntypes of *Trachycorystes coracoideus* Eigenmann, Allen, 1942). Deviation from this order is permissible only if an alternate arrangement shortens the text. If another arrangement is chosen, its use must be explained and justified in the Material and Methods section.

List material of non-focal species as **Comparative material examined**, using the same rules of arrangement stated above.

Large taxonomic revisions and reviews

Before presenting the taxonomic accounts, provide a table at the beginning, cited early, that lists all the species included in the revision that are new and those that are being redescribed. Taxon accounts can be arranged in two ways: presenting the new species descriptions first (in alphabetic order) and then the redescribed species (in alphabetic order), OR reporting all the

species in alphabetic order without separating new and redescribed ones. In either case, mentioning the words **new genus** or **new species** after the name of each new taxon presented, preceded by a comma. The chosen order of presentation should focus on brevity and comprehensibility

Further information Contact the Editor at neoichth@nupelia.uem.br

CAPÍTULO 2

Caracterização molecular sugere o envolvimento de mecanismos mistos na evolução dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* (Characidae: Stevardiinae)

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Gene*.

Caracterização molecular sugere o envolvimento de mecanismos mistos na evolução dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus* (Characidae: Stevardiinae)

Anahiê Bortoncello Prestes^a, Aline Nardelli^b, Marcelo Ricardo Vicari^c, Vladimir Pavan Margarido^{a,b}

^a *Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brasil.*

^b *Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária, 2069, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil.*

^c *Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brasil.*

Running title: 5S rDNA: estrutura e evolução em *Bryconamericus*.

***Autor correspondente:** Vladimir Pavan Margarido, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, Cascavel - Paraná 85819-110, Brasil. E-mail: vladimir.margarido@unioeste.br.

Resumo

Os genes de 5S rDNA compreendem sequências com 120 pb altamente conservadas e arrançadas em *tandem*, separadas entre si por espaçadores não transcritos (NTSs). Em *Bryconamericus*, a caracterização molecular destas sequências revelou a presença de duas variantes deste gene. A primeira variante (V1) compreendeu cópias gênicas funcionais, dotadas de regiões de controle interno para a RNA polimerase III (Box A, Elemento Intermediário e Box C), e estrutura secundária em Y composta por cinco hélices, condizendo com a estrutura secundária descrita para os 5S rRNAs de outros eucariotos. A segunda variante (V2) correspondeu a cópias truncadas (pseudogenes) com variação intra e interespecífica, decorrente de perdas nucleotídicas que afetaram os promotores e resultaram em estruturas secundárias sem funcionalidade quando associadas ao ribossomo. Dois NTSs foram também observados: O NTS 1 se mostrou altamente conservado entre as espécies, e contém as sequências TATA-like, Box GC e o resíduo C-1. O NTS 2 apresentou composição nucleotídica variável e a ausência das sequências de reconhecimento presentes no NTS 1. A presença de pseudogenes, associada a ocorrência de dois tipos de NTSs sugerem que em *Bryconamericus* a evolução dos genes de 5S rDNA envolve mecanismos mistos de Nascimento e Morte (gerando diversidade e perda genética) e Evolução Concertada (por homogeneização local), pois, por mais que a evolução em concerto ocorra, não é suficiente para homogeneizar toda a matriz.

Palavras-chave: Estrutura secundária, Mecanismos evolutivos, Pseudogenes, Variação gênica.

Destaques do manuscrito

- Caracterização molecular dos genes de 5S rDNA e a proposição da estrutura secundária do respectivo rRNA em *Bryconamericus*;
- Descrição de uma inserção do elemento transponível *hAT* e sua provável associação à dispersão dos genes de 5S rDNA no cariótipo;
- Descrição de duas variantes de 5S rDNA e dois tipos de NTSs;
- Proposição de mecanismos mistos de Nascimento e Morte e Evolução em Concerto envolvidos na dinâmica evolutiva dos genes de 5S rDNA no gênero.

Abreviações

A - Adenina;

C - Citosina;

2n - Número diploide;

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfato;

EI - Elemento intermediário;

ET - Elemento transponível;

G - Guanina;

hAT - Superfamília de ETs eucarióticos (nome derivado dos elementos *hobo-Ac-Tam3*);

pb - Pares de base;

PCR - Reação em cadeia da Polimerase;

rDNA - DNA que codifica um rRNA;

rRNA - RNA ribossômico;

T - Timina;

1 Introdução

Os genes de DNAs ribossomais (rDNAs) de eucariotos compreendem duas famílias multigênicas distintas (Martins e Wasko, 2004; Rebordinos et al., 2013), geralmente organizadas em grupos de centenas a milhares de cópias idênticas ou muito similares (Maeda et al., 2018). A primeira engloba os genes de 45S rDNA, que codificam os RNAs ribossômicos 18S, 5.8S e 26-28S e seus espaçadores (IGS, ITS1 e ITS2), enquanto a segunda contempla os genes de 5S rDNA que codificam os pequenos 5S rRNAs e seus espaçadores não transcritos (NTSs) (Martins e Wasko, 2004).

Em geral, as duas famílias multigênicas não estão ligadas em eucariotos, e em termos citogenéticos, localizam-se em pares de cromossomos distintos, compreendendo um par portador em invertebrados, um par portador de 5S rDNA e mais de um par portador de 45S em mamíferos, enquanto em anfíbios podem haver múltiplos pares portadores de ambas as famílias (Rebordinos et al., 2013). Em peixes, assim como em anfíbios, pode haver mais de um par de cromossomos portadores de genes ribossomais, em geral localizados em cromossomos distintos (Martins e Wasko, 2004). Entretanto, diversos estudos que utilizaram sondas para mapeamento de ambas as famílias multigênicas em peixes demonstraram a colocação dos genes de 5S e 18S rDNA. É o caso de *Prochilodus lineatus* (Vicari et al., 2006), *Bryconamericus cf. iheringii* (Piscor et al., 2013), *Hypostomus commersoni* (Bueno et al., 2014), *Thalassoma noronhanum*, *Halichoeres penrosei*, *H. poeyi*, *H. radiatus* e *H. brasiliensis* (Amorim et al., 2016), *Bryconamericus aff. iheringii* (rio Ijuí), *B. coeruleus*, *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni* (Prestes et al., Resultados não publicados).

Os genes de 5S rDNA de eucariotos são relativamente independentes dos outros genes de rDNA (45S), pois em sua maioria estão organizados em matrizes em *tandem* independentes daquelas dos demais genes ribossômicos, além de serem transcritas por RNAs polimerases distintas (RNAs Polimerase III e I, respectivamente) (Martins e Wasko, 2004). Os arranjos em *tandem* de 5S rDNA são caracterizados pela presença de várias unidades de transcrição com cerca de 120 pares de bases altamente conservados, separadas da unidade seguinte por um espaçador não transcrito (NTS) (Long e Dawid, 1980), variável em número e composição nucleotídica devido a eventos de deleção, inserção, sub-repetições internas, substituições de bases e pseudogenes (Rebordinos et al., 2013). Segundo Martins e Wasko (2004), os NTSs parecem ser regidos por mecanismos intensos de evolução, o que os tornam importantes fontes de estudos sobre a organização e evolução das famílias multigênicas, além de excelentes marcadores para traçar eventos evolutivos recentes.

Cada unidade transcricional de 5S rDNA contempla três regiões de controle interno (ICRs) conservadas: um Box A, que contém o domínio comum de ligação da RNA polimerase III, um Elemento Intermediário e um Box C, estes específicos dos genes de 5S rDNA, e considerados os principais responsáveis pela ligação estável do fator de transcrição TFIIIA (Pieler et al., 1987). A associação do TFIIIA ao Box C é o primeiro passo para a formação do complexo de início da transcrição, que segue pela ligação do fator geral de transcrição TFIIIC que, composto por duas subunidades (τA e τB), consegue ligar-se tanto ao DNA do Box A, quanto ao TFIIIA associado ao Box C, processo que leva ao recrutamento da RNA polimerase III e ao início da transcrição (Veldhoen et al. 1994, Male et al. 2015). Montante às regiões de controle interno, o espaçador não transcrito também apresenta sequências características e necessárias para a síntese do 5S rRNA funcional: uma Citosina imediatamente anterior ao ponto de início da transcrição (-1), um elemento rico em Guanina + Citosina (Box GC), e um elemento rico em A + T (*TATA-like*), que se assemelham a elementos regulatórios identificados também em outros tipos de genes (Venkateswarlu et al., 1991). O 5S rRNA transcrito é o menor rRNA em tamanho (120 nt) e peso molecular (40 KDa), e organiza-se em uma estrutura secundária em Y, característica pela presença de 5 hélices em eucariotos (Luehrsen e Fox, 1981; Szymanski et al., 2002; Ciganda e Williams, 2011).

Apesar das características altamente conservadas nos genes de 5S rDNA, estudos em eucariotos apontam a ocorrência de um sistema *dual*, ou seja, a organização das centenas/milhares de cópias deste gene em dois clusters de repetição em *tandem*, ambos transcritos pela RNA polimerase III (Ducrot et al., 2006), mas com padrões de expressão diferentes. Um exemplo disso foi relatado em *Xenopus laevis*, onde um cluster de 5S rDNA era expresso nas células somáticas e o outro somente nos oócitos, embora derivasse da classe somática por duplicação gênica (Komiya et al., 1986).

A característica de apresentar classes distintas de um mesmo gene, aliada à alta taxa de pseudogenes encontrados dentre as repetições em *tandem* de 5S rDNA, fez com que fosse levantada a hipótese de que estes genes evoluem através do mecanismo de Nascimento e Morte (origem de novos genes por duplicações sucessivas, seguida pela manutenção ou perda deles por acúmulo de mutações e formação de pseudogenes, ou por eventos de deleção gênica), e não por Evolução Concertada (onde todas as cópias gênicas evoluem em unidade), como ocorre com os demais genes ribossomais (Eirín-López et al., 2012). Entretanto, estudos na ostra *Crassostrea* revelaram que, apesar de haver duas classes de 5S rDNA, apenas uma delas apresentava arranjo em *tandem*, indicando que neste grupo a Evolução Concertada -

através de *crossing-over* desigual ou conversão gênica - é o mecanismo que rege a evolução dos genes de 5S rDNA (Cross et al., 2003). Estudos em peixes também sugerem a evolução em concerto dos genes de 5S rDNA, como em espécies de Moronidae (Merlo et al., 2010) e em *Rineloricaria latirostris* (Glugoski et al., 2018). Entretanto, alguns autores têm corroborado a ideia de que a evolução destes genes ribossomais é ainda mais complexa, e compreende eventos mistos de Nascimento e Morte e evolução em concerto (Freire et al., 2010; Pinhal et al., 2011, Eirín López et al., 2012, p. ex.), onde num primeiro momento ocorre a geração de diversidade genética (eventos de Nascimento e Morte), seguida pela transposição de várias unidades para pontos distintos do genoma, onde cada uma evolui em concerto de maneira independente, podendo levar a uma homogeneização local (Eirín-López et al., 2012).

Bryconamericus Eigenmann (1907) é um dos gêneros mais numerosos de Characidae, embora careça de estudos citogenéticos e moleculares. Prestes et al. (Resultados não publicados) realizaram o estudo citogenético mais amplo em *Bryconamericus*, caracterizando quatro espécies (*B. aff. iheringii* dos rios Ijuí e Iguaçu, *B. coeruleus*, *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni*), para as quais encontraram $2n=52$ cromossomos e variação interpopulacional e interespecífica de fórmulas cariotípicas. Piscor et al. (2013) realizaram o primeiro estudo de localização dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus*, e encontraram sítios simples deste gene em *B. cf. iheringii*, e múltiplos (quatro) em *B. turiuba*. Variação também foi encontrada no estudo de Prestes et al. (Resultados não publicados), sendo de dois/quatro sítios em *B. aff. iheringii*, quatro em *B. cf. ecai*, cinco em *B. cf. eigenmanni*, e dez/onze sítios em *B. coeruleus*.

Dada a dispersão dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus*, este trabalho contempla a caracterização molecular dos genes de 5S rDNA do gênero, a partir da análise de quatro espécies: *B. aff. iheringii* (duas populações: rio Ijuí e rio Iguaçu), *B. coeruleus*, *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni*, de três bacias hidrográficas brasileiras, com o objetivo de compreender a dinâmica evolutiva deste gene no grupo.

2 Material e Métodos

Foram analisados exemplares de quatro espécies de *Bryconamericus*, sendo dois machos e uma fêmea de *B. aff. iheringii* do rio Ijuí, bacia do Alto rio Uruguai (Estado do Rio Grande do Sul, Brasil) (28°18'06.3"S/53°53'33.6"O); um macho e duas fêmeas de *B. aff. iheringii* do rio Iguaçu, bacia do Baixo rio Iguaçu (Estado do Paraná, Brasil) (25°37'13.20"S/54°23'29.20"O); dois machos e uma fêmea de *B. coeruleus* do rio Piquiri, bacia do Alto rio Paraná (Estado do Paraná, Brasil)(24°56'54"S/52°35'49"O); um macho e

uma fêmea de *B. cf. ecai* e um macho de *B. cf. eigenmanni* do riacho Bigua, bacia do Alto rio Uruguai (Estado de Santa Catarina, Brasil) (26°53'22.5"S/53°23'03.1"O). Os indivíduos foram anestesiados e sacrificados por overdose de óleo de cravo (Griffiths, 2000) conforme aprovação no Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas da Unioeste: Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste, e depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

2.1 Amplificação, sequenciamento e análise das sequências de 5S rDNA

O DNA genômico foi extraído a partir do tecido hepático (Kit *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* Sigma-Aldrich®), seguindo recomendações do fabricante), quantificado em NanoK (Kasvi®), e diluído à concentração de 10 ng/μL. A amplificação dos genes de 5S rDNA foi realizada a partir dos *primers* 5Sa: 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3', e 5Sb: 5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3' (Pendás et al. 1994) num volume de 0,8 μL cada (10 mM), acrescidos a 4 μL de DNA genômico (10ng/ μL); 0,4 μL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) (1U); 0,4 μL de dNTP mix, e 1,2 μL de MgCl₂ em 4 μL de tampão (1 X: 200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCL). O programa de amplificação seguiu Glugoski et al. (2018): 5 min – 95°C / (30 s – 95°C / 45 s – 56°C / 2 min – 72°C) 30 ciclos / 7 min – 72°C.

A eletroforese em gel de agarose (2%) permitiu a identificação de dois fragmentos do gene de 5S rDNA amplificado, com aproximadamente 280 e 500 pb, os quais foram recortados do gel, purificados (Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* - Promega), e enviados para sequenciamento (Sanger) pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP). As análises de similaridade das sequências foram feitas usando o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e a ocorrência de possíveis inserções de elementos transponíveis nos NTSs foi verificada através do CENSOR (<https://www.girinst.org/censor/>). O alinhamento das sequências foi feito com o software Geneious®, e as estruturas bidimensionais foram construídas pela ferramenta RNA Fold em Geneious®, com temperatura de dobramento de 22° C.

3 Resultados

3.1 Caracterização dos genes de 5S rDNA

A eletroforese em gel de agarose revelou a presença de pelo menos dois fragmentos de 5S rDNA para todos os indivíduos analisados, um com aproximadamente 280 pb outro

com cerca de 500 pb. Cabe ressaltar que os primers utilizados possuem a característica de anelamento na região intersticial dos espaçadores não transcritos à montante e à jusante dos 120 pb que compreendem a cópia gênica funcional.

O fragmento de menor peso molecular (280 pb) não apresentou cópias íntegras dos genes de 5S rDNA, e o restante da sequência correspondente ao espaçador não transcrito (NTS) não apresentou similaridade com nenhuma sequência conhecida, tanto pela análise no BLAST quanto no CENSOR. No fragmento de maior peso molecular (500 pb) foi possível identificar pelo menos uma cópia gênica funcional para cada indivíduo analisado, a qual possuía composição nucleotídica muito similar entre as quatro espécies, exceto pela deleção de uma citosina em *B. cf. eigenmanni* e *B. coeruleus*, e de uma adenina em *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu), poucos pares de base após o ponto de início da transcrição (Fig. 1). Esta sequência contém aproximadamente 120 pb de região codificadora, um NTS de 82 pb, e uma região promotora interna composta por um Box A (+49 a +62 pb), um Elemento Intermediário (+70 à +71 pb) e um Box C (+81 a +90 pb), 30 pb distante do cluster poli-T. Há, ainda, uma sequência similar à TATA (-32 a -26 pb), GC box (-10 a -8), e uma Citosina em -1, localizados no NTS montante à região transcrita (Fig. 1).

Um NTS de 82 pb separa as cópias gênicas de 5S rDNA funcionais, chamadas de variante 1 (V1) em todos os indivíduos analisados, sendo que para todas as espécies a primeira cópia da sequência era funcional. Nas duas populações de *B. aff. iheringii*, em *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni*, (V1), a primeira cópia mostrou-se 92% similar ao 5S rDNA de *Symphysodon* sp. (Acesso GenBank: KP715281.1), enquanto em *B. coeruleus* a similaridade foi de 93% aos genes de 5S rDNA de *Mastacembelus armatus* (Acesso GenBank: XR_003297073.1).

Em *Bryconamericus cf. ecai* apenas uma cópia gênica íntegra de 5S rDNA foi observada, o que se deve a possíveis problemas no sequenciamento. Das espécies analisadas, apenas *B. cf. eigenmanni* e *B. aff. iheringii* do rio Iguaçu apresentaram duas cópias íntegras de 5S rDNA potencialmente funcionais (V1). Nesta espécie, a terceira cópia de 5S rDNA encontra-se distante 79 pb da segunda, e apresenta 89% de similaridade ao 5S rDNA de *Oreochromis niloticus* (Acesso GenBank: XR_003216106.1).

Bryconamericus aff. iheringii do rio Ijuí e *B. coeruleus* não apresentaram uma segunda cópia íntegra de 5S rDNA, mas uma sequência truncada, caracterizada por substituições de base e deleções de partes da sequência que seria funcional. Estas cópias foram chamadas de variante 2 (V2) por motivos de diferenciação, e diferentemente da variante 1, funcional, V2 apresentou variação intra e interespecífica, devido a diferenças nas

regiões mutadas, embora em todos os casos as deleções/substituições de base tenham afetado as sequências de reconhecimento para a RNA Polimerase III, como é o caso do Box C (Fig. 2), tornando-as prováveis pseudogenes que resultariam num RNA não funcional (Fig. 4B, C). Um dos indivíduos de *B. coeruleus* analisados, por sua vez, apresentou, nesta segunda cópia gênica, 80% de similaridade ao 5S rDNA de *Plectorhinchus mediterraneus* (Acesso GenBank: JN850641.1), embora com diferença nucleotídica considerável em relação à cópia funcional, mais conservada.

Foi possível identificar dois tipos de NTSs em *Bryconamericus*, exceto em *B. cf. ecai* e *B. cf. eigenmanni*, que apresentaram sequências menores. O primeiro tipo, chamado por nós de NTS Tipo I (82 pb), mostrou-se altamente conservado tanto dentro da espécie quanto entre as espécies/populações, como é possível visualizar na Figura 1, e compreende os dois primeiros NTSs de todas as sequências. O segundo tipo (NTS Tipo II) foi caracterizado pela divergência de número (85-87 pb) e composição nucleotídica, tanto intra quanto interespecífica e interpopulacional, além da ausência das regiões potencialmente envolvidas na transcrição (TATA-like, Box GC e resíduo C-1), e compreende ao terceiro NTS de cada uma das sequências das espécies anteriormente citadas. Um dos indivíduos de *B. aff. iheringii* do rio Iguazu apresentou a inserção de um fragmento de 45 pb, 84,4% similar ao filamento complementar, invertido, do transposon de DNA *hAT-2*, de *Drosophila kikkawai* (*hAT-2_DK*) (CENSOR) no NTS II (Fig. 3).

3.2 Estrutura secundária para o 5S rRNA

A estrutura bidimensional para o 5S rRNA, proposta a partir da sequência consenso das quatro espécies/populações deste trabalho, apresentou o formato em Y, com energia livre de -61,21 kcal/mol, cinco hélices, sete alças, dois *hairpins* internos e dois externos, e um ponto de articulação (Fig 4A). As estruturas secundárias construídas a partir dos pseudogenes (V2) diferiram estruturalmente dos genes funcionais sobretudo pela ausência do ponto de articulação - perdendo a característica em Y, - e da ocorrência de variadas alças ao longo da estrutura (Fig. 4B, C).

4 Discussão

As sequências dos genes de 5S rDNA de *Bryconamericus* permitiram a identificação de duas variantes em pelo menos duas das quatro espécies analisadas: *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) e *B. coeruleus*, espécies que também apresentaram maior variação no número de cístrons de 5S rDNA e de sentenias ao 18S rDNA no trabalho de Prestes et al. (Resultados não

publicados). Uma das cópias foi evidenciada como funcional no gênero (V1), enquanto a outra não (V2). Esta condição foi relatada também para outras espécies de peixes como *Potamotrygon falkneri*, *P. motoro*, *Paratrygon aiereba* (Pinhal et al., 2011) e *Ancistrus* sp. (Barros et al., 2017). Estes genes ribossomais são transcritos pela enzima RNA polimerase III, que para tal, necessita de algumas sequências conservadas de reconhecimento, as quais, curiosamente, são encontradas jusante ao ponto +1 de início da transcrição (Paule e White, 2000). Estas sequências foram encontradas íntegras em todas as cópias gênicas da primeira variante de 5S rDNA de *Bryconamericus*, que por isso foi considerada funcional, e compreendem aos promotores internos Box A, EI e Box C, além de outras regiões constantes nos NTSs deste gene, como uma sequência curta semelhante a TATA (-32 a -26 pb), um Box GC (-10 a -8), um resíduo C (-1), e cerca de 4 timinas necessárias para cessar a transcrição (terminador poli-T) (Venkateswarlu et al. 1991, Paule e White, 2000). Os promotores internos para RNA polimerase III, chamados de promotor do tipo I, são exclusivos dos genes de 5S rDNA (Paule e White, 2000) e já foram descritos em diversos organismos, dentre os quais *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 1995), *Drosophila melanogaster* (Sharp e Garcia, 1988), *Xenopus laevis* (Pieler, Hamm e Roeder, 1987), *Ancistrus* sp. (Barros et al., 2017), e *Rineloricaria latirostris* (Glugoski et al., 2018).

A sequência de 5S rDNA funcional transcrita e seu espaçador não transcrito (NTS tipo I) apresentaram-se altamente conservados tanto dentro quanto entre as quatro espécies analisadas, exceto por pequenas variações nucleotídicas, como deleções e substituições de bases (Fig. 1), que são comuns nesses genes e não afetam sua funcionalidade desde que não ocorram nas regiões de controle interno. Segundo Barros et al. (2017), as substituições de nucleotídeos podem significar a divergência de tecidos ou fases de desenvolvimento em que estas cópias gênicas são expressas, como já registrado em *Xenopus laevis* (Komiya et al., 1986) e *Arabidopsis thaliana* (Mathieu et al., 2003) - nestes casos em associação às regiões heterocromáticas, - e em *Zebrafish*, onde foram identificados dois tipos de 5S rRNA sendo um do tipo materno, acumulado exclusivamente durante a oogênese e substituído por toda a embriogênese por um tipo somático, que permanece nos tecidos adultos (Locati et al., 2017).

A estrutura secundária da cópia funcional de 5S rDNA de *Bryconamericus* foi equivalente entre as três espécies, e permitiu que fosse criada uma estrutura secundária única a partir da sequência consenso decorrente do alinhamento das sequências de 5S rDNA funcionais e NTS Tipo I das quatro espécies de *Bryconamericus* (Fig. 4A). O resultado foi uma estrutura em Y, formato característico do 5S RNA, num arranjo de cinco alças, sete hélices e um ponto de articulação, correspondente ao encontrado por Barros et al. (2017), e

muito similar a 5S rRNAs de outros eucariotos (Luehrsen e Fox, 1981; Ciganda e Williams, 2011; Castro et al., 2016). Embora possua duas alças a mais do que o sugerido por Luehrsen e Fox (1981) para eucariotos, o 5S rRNA de *Bryconamericus* apresentou várias das características apontadas como conservadas neste grupo, dentre as quais a presença de 16 pb entre as hélices I e IV, separadas entre si por um par GU; as bases CA no início da alça “A”; os pares de base UC e AG, conservados em eucariotos e posteriores à hélice III; a sequência AGUA compondo um lado da alça “E”, e duas adeninas presentes no lado oposto desta alça, seguidas por uma guanina; e as bases AG_G, conservadas no contorno da alça G (Fig. 4A). A satisfação dessas condições reforça a viabilidade dos 5S rRNAs transcritos a partir dessas cópias gênicas.

A comparação entre as duas variantes de 5S rDNA de *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) e *B. coeruleus*, apontou para a provável não funcionalidade da variante V2, isto porque estas regiões corresponderam a cópias de tamanho variável mesmo intraespecíficas, devido ao acúmulo de mutações como deleções e substituições de bases, ocorridas de forma a modificar os promotores internos para a RNA polimerase III (Fig. 3). Além disso, a estrutura secundária originada a partir destas sequências não apresenta a conformação em Y, nem as alças e hélices necessárias para a sua correta função no ribossomo (Fig. 4B, C) (Ciganda e Williams, 2011). Resultados similares a estes foram observados em *Ancistrus* sp. (Barros et al., 2017), embora a estrutura secundária tenha sido divergente. A falta de uma sequência de codificação intacta destrói eficazmente a estrutura secundária da molécula de 5S rRNA que de outro modo teriam codificado (Rooney e Ward, 2005), por isso consideramos estas sequências truncadas em *Bryconamericus* como pseudogenes.

Duas variantes de NTS também foram encontradas entre as espécies deste trabalho. A primeira, NTS I, flanqueia os 120 pb codificantes de 5S rDNA (V1), e apresenta 82 pb de elevada similaridade mesmo entre as espécies. A comparação dos NTS de vários organismos, incluindo *Megaleporinus* spp. (citado como *Leporinus* spp.) demonstra que um NTS de pelo menos 80 pb, tal como encontrado em *Bryconamericus*, pode compreender um tamanho mínimo para a organização e atividade deste DNA no genoma (Martins e Galetti-Jr, 2001). Em contrapartida, o NTS II compreende a terceira cópia de NTS em todas as sequências (exceto em *B. cf. eigenmanni* e *B. cf. ecai*, por possíveis problemas no sequenciamento), e apresenta diferença significativa em composição nucleotídica quando comparado ao NTS I, inclusive pela ausência das regiões de controle (TATA-like, Box GC e C-1) embora em tamanho não seja muito divergente (Fig. 3). Martins e Galetti-Jr (2001) também encontraram dois tipos de NTS nas sequências de *Megaleporinus*, no entanto, as regiões divergiam em

tamanho mas exibiam as regiões de controle montantes ao ponto de início de transcrição, indicando que as cópias gênicas flanqueadas por ambos os NTSs eram potencialmente funcionais.

Diferente das outras espécies de *Bryconamericus*, o NTS II de *B. aff. iheringii* (rio Iguaçu) apresentou dentre seus nucleotídeos, um fragmento similar ao elemento transponível (ET) *hAT*, uma superfamília de ETs eucarióticos, cujo nome deriva das primeiras letras dos três transposons que o compõe: *Hobo*, de *Drosophila melanogaster*; *Activator*, de *Zea mays* e *Tam3*, de *Antirrhinum majus* (Rubin, Lithwick e Levy, 2001). Glugoski et al. (2018) também encontraram dentre os NTSs de *Rineloricaria latirostris*, a inserção de um fragmento similar ao ET *hAT* de *Salmo salar*, denotando que esta superfamília de ETs é relativamente comum dentre os genes de 5S rDNA de peixes. Os autores sugeriram que esta sequência estaria envolvida no processo de dispersão dos genes ribossomais no genoma, o que poderia explicar parte dos rearranjos cromossômicos apresentados no grupo. Em *Bryconamericus*, no entanto, a população que apresentou a inserção do fragmento de *hAT* possui cístrons simples de 5S rDNA evidenciados por FISH (Prestes et al., Resultados não publicados), o que, em termos evolutivos, pode representar que o processo de dispersão dessas sequências ainda não foi efetivado, considerando-se que os eventos de inserção de elementos genéticos móveis precedem a dispersão dos genes aos quais estão relacionados.

Segundo Nelderby et al. (1993), a alta similaridade entre os NTSs tanto dentro das espécies, pode ser explicada tanto pela evolução em concerto quanto pela forte seleção purificadora, devido à regulação gênica. Acredita-se que vários mecanismos atuem na evolução de famílias multigênicas e sequências duplicadas, impulsionando sua acumulação, divergência ou mesmo deleção do genoma (Pinhal et al., 2011). A Evolução Concertada, onde os genes em *tandem* evoluem como uma matriz única, compreende um modo ‘não usual’ de evolução, pois ocasiona a homogeneização de diferentes cópias gênicas que tiveram origem a partir de uma mesma cópia ancestral numa mesma espécie, através de mecanismos como eventos de *crossing-over* desigual e conversão gênica (Walsh e Stephan, 2001; Holsinger, 2017).

A Evolução Concertada tem sido proposta como o principal mecanismo de evolução dos genes de 5S rDNA de peixes, e de outras famílias multigênicas capazes de produzir grandes quantidades de produtos gênicos (Ohta e Dover, 1989, Nei e Rooney, 2005). Este modelo evolutivo é capaz de justificar a aparente homogeneidade intraespecífica observada entre as cópias dos genes ribossomais, somada à divergência nucleotídica encontrada em *loci* ortólogos ou nos espaçadores intergênicos, ainda que em espécies filogeneticamente

próximas, como foi descrito por Brown et al. (1972) ao compararem os genes de RNAs ribossomais de *Xenopus laevis* e *X. mulleri*. Entretanto, esse mecanismo evolutivo desconsidera que, em alguns casos, a taxa de homogeneização intraespecífica das cópias gênicas é baixa, e polimorfismos são mantidos (Pinhal et al., 2011). Nessas condições, a funcionalidade dos produtos gênicos pode ser mantida pela forte seleção purificadora, sem que ocorra Evolução Combinada (Nei e Rooney, 2005).

A seleção purificadora é a principal força homogeneizadora dos genes que evoluem por Nascimento e Morte, e mantêm similaridade independente da evolução em concerto. A evolução por Nascimento e Morte é caracterizada pela origem de novos genes por eventos sucessivos de duplicação a partir de um gene ancestral, os quais podem ser mantidos a longo prazo no genoma, perdidos por deleção ou através da sua degeneração em pseudogenes (Hughes e Nei, 1992; Nei et al., 1997; Nei e Rooney, 2005; Rebordinos et al., 2013; Benton, 2015). É o caso das famílias de histonas H1 (Eirín-López et al., 2004; Eirín-López et al., 2005; Eirín-López et al., 2012; Ponte et al., 2017), H2A (Eirín-López et al., 2012), H3 (Rooney et al., 2002; Eirín-López et al., 2012), e H4 (Piontkivska et al., 2002); dos genes quimiossensoriais de insetos (Sánchez-Gracia et al., 2009; Eirín-López et al., 2012; Benton, 2015), e da família multigênica da ubiquitina (Nei et al., 2000), quando sob uma forte seleção purificadora. Por outro lado, estudos na superfamília do gene Hsp70 em nematoides (Nikolaidis e Nei, 2004) e na família de genes da amilase de *Drosophila* (Zhang et al., 2005), revelaram um misto de processos evolutivos envolvidos (Nascimento e Morte + Evolução Concertada).

Segundo Eirín-López et al. (2012), a maneira mais comum de determinar se a evolução de determinada família multigênica é guiada pelo Nascimento e Morte e não pela Evolução Concertada é a presença, no genoma, tanto de um padrão de agrupamento de genes interespecífico quanto de pseudogenes, embora esta condição possa levar a concepções equivocadas quando há altas taxas de *turnover* ou quando sob uma forte pressão purificadora (Nei et al., 2000).

Vários estudos em peixes evidenciaram a presença de pseudogenes dentre os genes funcionais de 5S rDNA, como em *Oreochromis niloticus* (Martins et al., 2002). O fato de terem sido observados pseudogenes dentre as sequências de 5S rDNA de *Bryconamericus*, sugere fortemente que esta família multigênica evoluiu sob um processo de Nascimento e Morte (Rooney e Ward, 2005, Li et al., 2017). A alta similaridade das cópias gênicas funcionais mesmo entre espécies distintas no presente estudo, sugere que estas espécies divergiram entre si muito antes do que os seus genes na sua história evolutiva, ao mesmo

tempo em que as variações intraespecíficas das cópias gênicas não funcionais e dos NTSs tipo II foram tão altas quanto as variações interespecíficas, contrário ao que se esperaria se a evolução em concerto fosse o único mecanismo evolutivo atuante. Deste modo, não podemos descartar nenhum dos dois processos evolutivos.

Uma combinação complexa de duplicações, inserções, deleções e rearranjos gerais do genoma provavelmente esteve envolvida na evolução da família do gene 5S rRNA em vertebrados (Pinhal et al., 2011). Neste trabalho sugerimos que mecanismos mistos podem estar envolvidos na dinâmica evolutiva dos genes de 5S rDNA em *Bryconamericus*, como já sugerido para outros grupos (Martins e Wasko, 2004; Fujiwara et al., 2008; Pinhal et al., 2011), isto porque, dentre as evidências anteriormente citadas, a presença de duas variantes de NTS dentro de cada espécie deste gênero mostra que, por mais que ocorra, a Evolução Concertada não é capaz de homogeneizar toda a matriz. Deste modo, o processo de Nascimento e Morte é responsável pela expansão da família multigênica de 5S rDNA e da sua contração por perda genética (através de mecanismos como *crossing-over* desigual, p. ex.), sendo que, eventualmente, cópias gênicas distintas acumulam mutações e degeneram em pseudogenes (V2). A partir daí a Evolução Concertada dirige o processo de homogeneização local das diferentes unidades, possivelmente após a sua transposição (mediada ou não por elementos transponíveis, como os *hAT*) para locais cromossômicos distintos (Nei e Rooney, 2005; Fujiwara et al., 2009; Vierna et al., 2009; Vierna et al., 2011; Freire et al., 2010; Ubeda-Manzanaro et al., 2010; Pinhal et al., 2011; Vierna et al., 2013), resultando na dispersão destes cístrons gênicos observada nestas espécies.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA / ICMBio) pela autorização da captura de peixes (Licença número: SISBIO 10522-1). Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá (UEM), à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Parque Nacional do Iguaçu, ao Macuco Safari e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) pelo apoio logístico. Este estudo foi financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pelo CNPq (Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela FPTI (Fundação Parque Tecnológico de Itaipu), e realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Número de Licença: Protocolo 13/09 - CEEAAP / Unioeste).

6 Referências

- Amorim, K.D.J., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Soares, R.X., Souza, A.S., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F., 2016. Co-located 18S/5S rDNA arrays: an ancient and unusual chromosomal trait in *Julidini* species (Labridae, Perciformes). *Comp Cytogenet* 10, 555-70.
- Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608, 20-27.
- Benton, R., 2015. Multigene Family Evolution: Perspectives from Insect Chemoreceptors. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 30, 590-600.
- Brown, D.D., Wensink, P.C., Jordan, E., 1972. *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J Mol Biol* 63, 57–73.
- Bueno, V., Venere, P.C., Konerat, J.T., Zawadzki, C.H., Vicari, M.R., Margarido, V.P., 2014. Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. *SCI World J* 2014,1-8.
- Castro, S.I., Hleap, J.S., Cárdenas, H., Blouinc, C., 2016. Molecular organization of the 5S rDNA gene type II in elasmobranchs. *RNA Biol* 13, 391-399.
- Ciganda, M., Williams, N., 2011. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 523–533.
- Cross, I., Vega, L., Rebordinos, L., 2003. Nucleolar organizing regions in *Crassostrea angulata*: chromosomal location and polymorphism. *Genetica* 119, 65– 74.
- Ducrot, C., Lefebvre, O., Landrieux, E., Guirouilh-Barbat, J., Sentenac, A., Acker, J., 2006. Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem* 281, 11685–11692.

- Eirín-López, J.M., González-Tizón, A.M., Martínez, A., Méndez, J., 2004. Birth-and-Death Evolution with Strong Purifying Selection in the Histone H1 Multigene Family and the Origin of orphan H1 Genes. *Molec Biol Evol* 21, 1992-2003.
- Eirín-López, J.M., Ruiz, M.F., González-Tizón, A.M., Martínez, A., Ausiós, J., Sánchez, L., Méndez, J., 2005. Common Evolutionary Origin and Birth-and-Death Process in the Replication-Independent Histone H1 Isoforms from Vertebrate and Invertebrate Genomes. *J Mol Evol* 61, 398-407.
- Eirín-López, J.M., Rebordinos, L., Rooney, A.P., Rozas, J., 2012. The Birth- and- Death Evolution of Multigene Families Revisited. In: Garrido-Ramos, M.A. (Org.) Repetitive DNA. *Genome Dyn. Basel*, pp. 170-196.
- Freire, R., Arias, A., Insua, A., Méndez, J., Eirín- Lopez, J.M., 2010. Evolutionary dynamics of the 5S rDNA gene family in the mussel *Mytilus*: mixed effects of birth-and-death and concerted evolution. *J Mol Evol* 70, 413– 426.
- Fujiwara, M., Inafuku, J., Takeda, A., Watanabe, A., Fujiwara, A., Kohno, S., Kubota, S., 2008. Molecular organization of 5S rDNA in bitterlings (Cyprinidae). *Genetica* 135, 355–365.
- Glugoski, L., Giuliano-Caetano, L., Moreira-Filho, O., Vicari, M.R., Nogaroto, V., 2018. Co-located *hAT* transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* 650, 49-54.
- Griffiths, S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J Fish Biol.* 57, 1453-1564.
- Holsinger, K.E., 2017. Evolution in multigene families. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/911a/d75b7f4c94283918842234b3b19dfc3df1d9.pdf>, acesso em 17 Nov. 2018.

- Hughes, A.L., Nei, M., 1989. Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol Biol Evol* 6, 559–579.
- Komiya, H., Hasegawa, M., Takemura, S., 1986. Differentiation of oocyte and somatic-type 5S rRNAs in animals. *J Biochem* 100, 369-374.
- Lee, Y., Erkin, A.M., Van Ryk, D.I., and Nazar, R.N. (1995). In vivo analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23, 634–640.
- Li, Y., Yang, R.H., Jiang, L, Hu, X.D., Wu, Z.J., Yao, Y.J., 2017. rRNA Pseudogenes in Filamentous Ascomycetes as Revealed by 1 Genome Data. *Genes Genom Genetic*. DOI: 10.1534/g3.117.044016.
- Locati, M.D., Pagano, J.F.P., Ensink, W.A., Olst, M., Leeuwen, S., Nehrlich, U., Zhu, K., Spaink, H.P., Girard, G., Rauwerda, H., Jonker, M.J., Dekker, R.J., Breit, T.M., 2017. Linking maternal and somatic 5S rRNA types with different sequence-specific non-LTR retrotransposons. *RNA* 23, 446–456.
- Long, E.O., Dawid, I.B., 1980. Repeated genes in Eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49, 727-764.
- Luehrsen, K.R., Fox, G.E., 1981. Secondary structure of eukaryotic cytoplasmic 5S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci* 78, 2150–2154.
- Male, G., Appen, A., Glatt, S., Taylor, N.M.I., Cristovao, M., Groetsch, H., Beck, M., Müller, C.W., 2015. Architecture of TFIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nat Commun* 6, 1-11. DOI: 10.1038/ncomms8387.
- Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I., Tourmente, S., 2003. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2929–2939.

- Martins, C., Galetti, P.M.Jr., 2001. Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct non-transcribed spacers (NTSs). *Genome* 44, 903-910.
- Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C., Porto-Foresti, F., Parise-Maltempi, P.P., Wright, J.M., Foresti, F., 2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98, 78-85.
- Martins, C., Wasko, A.P., 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Willians, C.R. (Ed.), *Focus on Genome Research*. New York: Science Publishers, pp.289-318.
- Merlo, M.A., Cross, I., Chairi, H., Manchado, M., Rebordinos, L., 2010. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes Genet Syst* 85, 341– 349.
- Nederby, N.H., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sorensen, P.D., Lomholt, B., 1993. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 26, 3631-3636.
- Nei, M., Gu, X., Sitnikova, T., 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci* 94,7799-7806.
- Nei, M., Rogozin, I.B., Piontkivska, H., 2000. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc Natl Acad Sci* 97,10866-10871.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution in multigene families. *Annu Rev Genet* 39, 121-152.
- Nikolaidis, N., Nei, M., 2004. Concerted and nonconcerted evolution of the Hsp70 gene superfamily in two sibling species of nematodes. *Molec Biol Evol* 21, 498-505.

- Ohta, T., Dover, G.A., 1984. The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108, 501-521.
- Paule, M.R., White, R.J., 2000. Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28, 1283–1298.
- Pendás, A.M., Moran, P., Freije, J.P., Garcia-Vazquez, E., 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Genome Res.* 67, 31–36.
- Pieler, T., Hamm, J., Roeder, R.G., 1987. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 48, 91-100.
- Piontkivska, H., Rooney, A.P., Nei, M., 2002. Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family. *Mol Biol Evol* 19, 689-697.
- Piscor, D., Ribacinco-Piscor, D.B., Fernandes, C.A., Parise-Maltempi, P.P., 2013. Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Mol Cytogenet* 6, 1-13.
- Pinhal, D., Yoshimura, T.S., Araki, C.S., Martins, C., 2011. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater tinagrays. *BMC Evol Biol* 11, 1-14.
- Ponte, I., Romero, D., Yero, D., Suau, P., Roque, A., 2017. Complex Evolutionary History of the Mammalian Histone H1.1–H1.5 Gene Family. *Molr Biol Evol* 34, 545-558.
- Prestes, A.B., Nardelli, A., Paiz, L.M., Margarido, V.P. (Resultados não publicados). Marcadores citogenéticos como ferramenta na delimitação de espécies em um grupo de peixes neotropicais altamente diverso.

- Rebordinos, L., Cross, I., Merlo, A., 2013. High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. *Cytogenet Genome Res* 141, 103-113.
- Rooney, A.P., Ward, T.J., 2005. Evolution of large ribosomal RNA multigene Family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc Natl Acad Sci* 102, 5084-5098.
- Rubin, E., Lithwick, G., Levy, A.A., 2001. Structure and evolution of the hAT transposon superfamily. *Genetics* 158, 949-957.
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, F.G., Rozas, J., 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity* 103, 208-216.
- Sharp, S.J., Garcia, A.D., 1988. Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements. *Mol Cell Biol* 8, 1266-1274.
- Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., Barciszewska, J., 2002. 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res* 30, 176–178.
- Ubeda-Manzanaro, M., Merlo, M.A., Palazón, J.L., Sarasquete, C., Rebordinos, L., 2010. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. *Genome* 53, 723-730.
- Veldhoen, N., You, Q., Setzer, D. R., Romaniuk, P. J., 1994. Contribution of Individual Base Pairs to the Interaction of TFIIIA with the *Xenopus* 5S RNA Gene. *Biochemistry* 33, 7568–7575.
- Vicari, M.R., Almeida, M.C., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., Artoni, R.F., 2006. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet Mol Biol* 29, 621-25.

- Venkateswarlu, K., Lee, S.W., Nazar, R.N., 1991. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene* 105, 249–253.
- Vierna, J., Gonzalez-Tizon, A., Martinez-Lage, A., 2009. Long-term evolution of 5S ribosomal DNA seems to be driven by birth-and-death processes and selection in *Ensis* razor shells (mollusca: Bivalvia). *Biochem Genet* 47, 635-644.
- Vierna, J., Jensen, K.T., Martínez-Lage, A., González-Tizón, A.M., 2011. The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). *Heredity* 107, 127–142.
- Vierna, J., Wehner, S., Siederdisen, C.H., Martínez-Lage, A., Marz, M., 2013. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity* 111, 410-421.
- Walsh, J.B., Stephan, W., 2001. Multigene Families: Evolution. *Encycl Life Sci*. DOI:10.1038/npg.els.00017021.
- Zhang, Z., Inomata, N., Yamazaki, T., Kishino, H., 2003. Evolutionary history and mode of the amylase multigene family in *Drosophila*. *J Mol Evol* 57, 702-709.

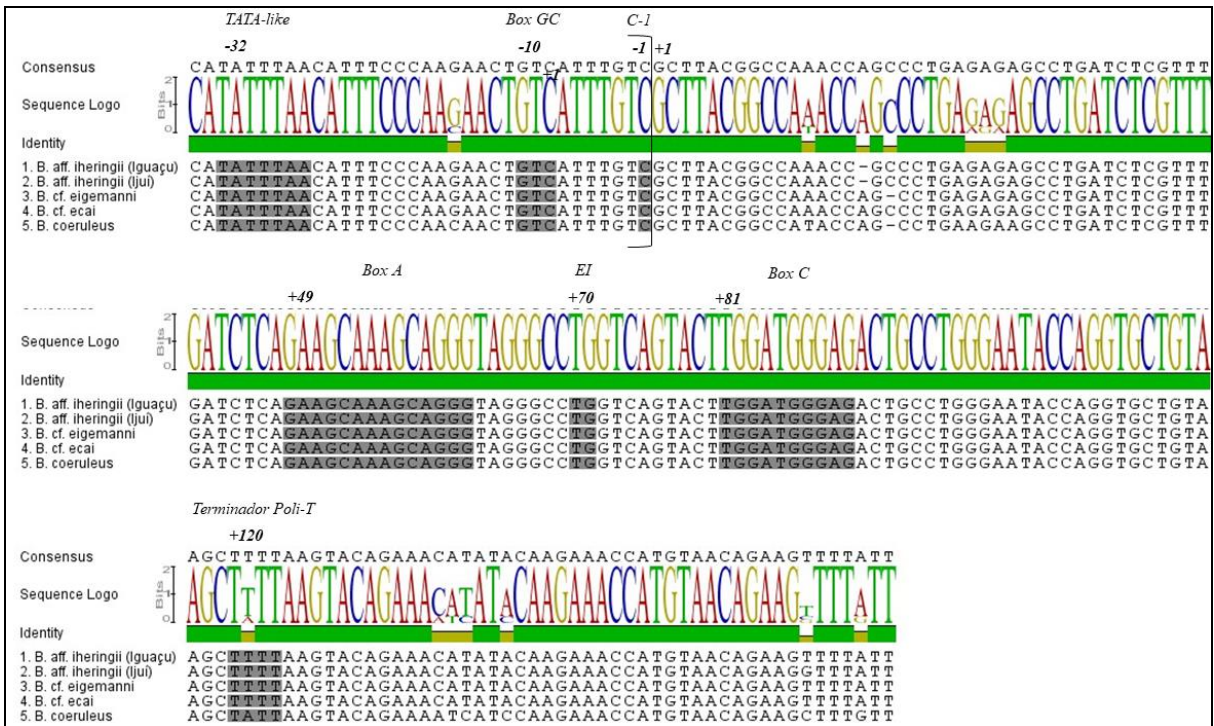


Fig. 1 Alinhamento das sequências de 5S rDNA funcionais e NTS Tipo I das quatro espécies de *Bryconamericus*. Os nucleotídeos destacados em cinza compreendem as regiões essenciais para a transcrição gênica e formação do 5S rRNA funcional: uma sequência curta similar a TATA (*TATA-like*, -32), um Box GC (-10), um resíduo C (-1), um Box A (+49), um Elemento Intermediário (EI, +70), um Box C (+81), além do Terminador Poli-T (+120).

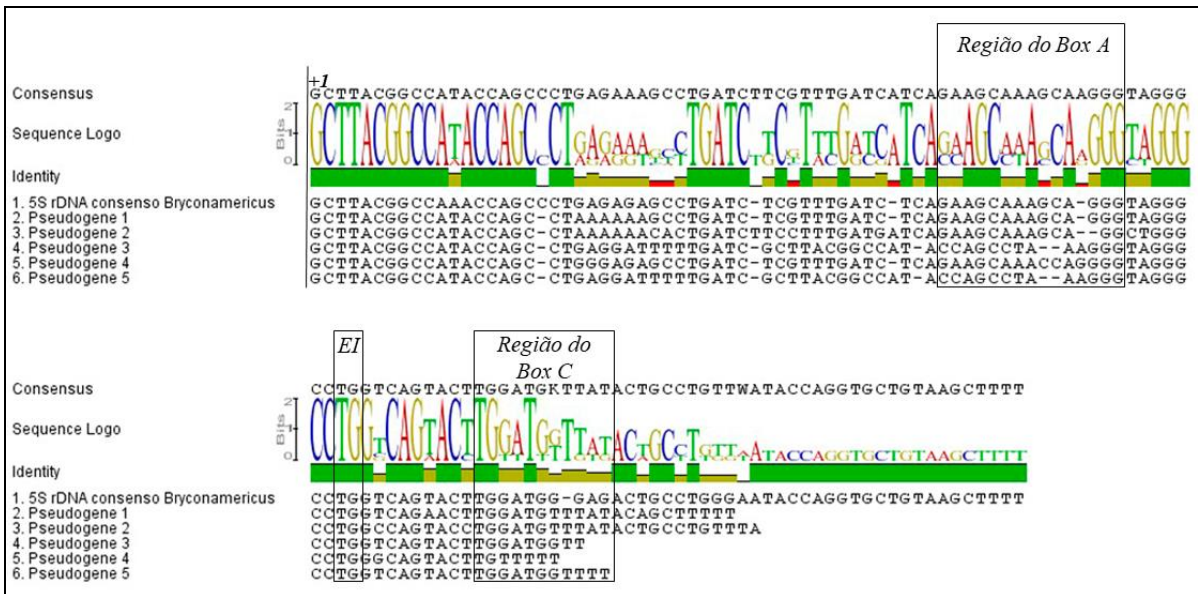


Fig. 2 Alinhamento comparativo entre a sequência consenso funcional de 5S rDNA (V1) de *Bryconamericus*, construída a partir das sequências consenso de cada espécie/população, e os pseudogenes encontrados em dois indivíduos de *B. coeruleus* (pseudogenes 1 e 2), e três indivíduos de *B. aff. iheringii* (pseudogenes 3, 4 e 5) (V2). Os quadros indicam a localização da Região do Box A e da Região do Box C.

estimada dos promotores internos para RNA polimerase III, evidenciando a ocorrência de deleções nos pseudogenes em relação ao gene funcional (5S rDNA consenso *Bryconamericus*).

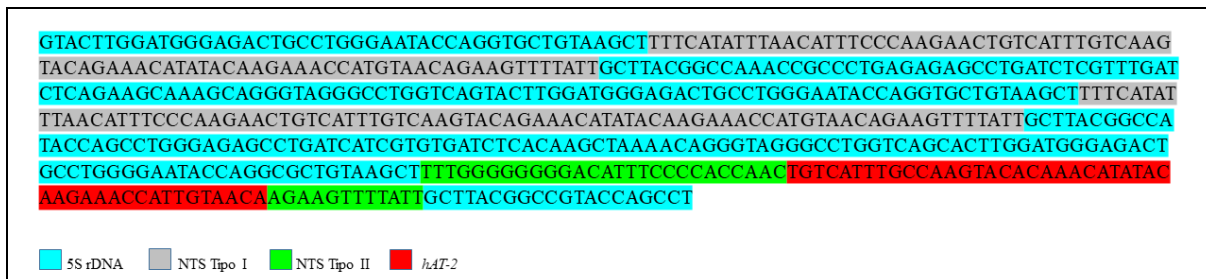


Fig. 3 Fragmento com 555 pb de *Bryconamericus* aff. *iheringii* do rio Iguaçu, evidenciando a presença de 48 pb referentes ao gene de 5S rDNA inicial, seguido por duas cópias funcionais deste gene (120 pb + 3 timinas terminais pertencente ao NTS, em azul), intercaladas entre si por espaçadores não transcritos (NTS tipo I, em cinza, e NTS tipo II, em verde). O último NTS (NTS tipo II) da sequência apresenta uma inserção de 45 pb correspondentes ao filamento complementar invertido do elemento transponível *hAT* de *Drosophila kikkawai* (*hAT-2_DK*, em vermelho).

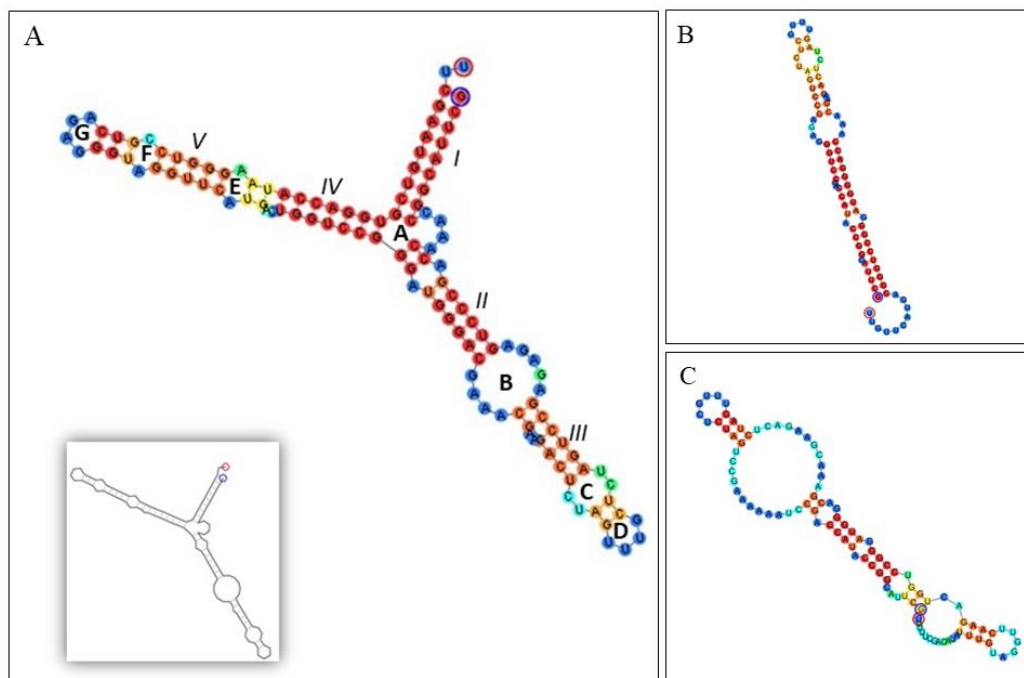


Fig. 4 Estrutura secundária dos 5S rRNAs de *Bryconamericus*: A Estrutura consenso para o gênero, evidenciando a estrutura em Y característica deste gene, com a presença de cinco hélices (I-V), sete alças (A-G) e um ponto de articulação; B e C Estruturas construídas a partir de pseudogenes encontrados em *B. aff. iheringii* (rio Ijuí) e *B. coeruleus*, respectivamente.

ANEXO 2

Normas para publicação no periódico *Gene*

DESCRIPTION

Gene has an open access mirror journal Gene: X, sharing the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review.

Gene publishes papers that focus on the **regulation, expression, function and evolution** of **genes** in all biological contexts, including all prokaryotic and eukaryotic organisms, as well as viruses.

Gene strives to be a very diverse journal and topics in all fields will be considered for publication. Although not limited to the following, some general topics include:

- DNA Organization, Replication & Evolution -Focus on genomic DNA (chromosomal organization, comparative genomics, DNA replication, DNA repair, mobile DNA, mitochondrial DNA, chloroplast DNA).
- Expression & Function - Focus on functional RNAs (microRNAs, tRNAs, rRNAs, mRNA splicing, alternative polyadenylation)
- Regulation - Focus on processes that mediate gene-read out (epigenetics, chromatin, histone code, transcription, translation, protein degradation).
- Cell Signaling - Focus on mechanisms that control information flow into the nucleus to control gene expression (kinase and phosphatase pathways controlled by extra-cellular ligands, Wnt, Notch, TGFbeta/BMPs, FGFs, IGFs etc.)
- Profiling of gene expression and genetic variation - Focus on high throughput approaches (e.g., DeepSeq, ChIP-Seq, Affymetrix microarrays, proteomics) that define gene regulatory circuitry, molecular pathways and protein/protein networks.
- Genetics - Focus on development in model organisms (e.g., mouse, frog, fruit fly, worm), human genetic variation, population genetics, as well as agricultural and veterinary genetics.
- Molecular Pathology & Regenerative Medicine - Focus on the deregulation of molecular processes in human diseases and mechanisms supporting regeneration of tissues through pluripotent or multipotent stem cells.

Gene encourages [submission](#) of novel manuscripts that present a reasonable level of analysis, functional relevance and/or mechanistic insight. Gene also welcomes papers that have predominantly a descriptive component but improve the essential basis of knowledge for subsequent functional studies, or provide important confirmation of recently published discoveries.

The primary criteria for acceptance are that the work is original and scientifically sound. The journal appreciates that standards of novelty are arbitrary, differ among disciplines and geographic locations, as well as change with time. In partnership with [Editors](#), Referees and Authors, the journal will promote the revision of papers to ensure that accepted papers are reasonably complete and competitive with concurrent submissions in a given field.

AUDIENCE

Molecular biologists, geneticists, biotechnologists

IMPACT FACTOR

2017: 2.498 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
 BIOSIS
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 EMBASE
 MEDLINE®
 Pascal et Francis (INST-CNRS)
 Science Citation Index
 Reference Update
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Co Editors-in-Chief:

A.J. van Wijnen, Dept. of Orthopedic Surgery, Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, Minnesota, MN 55905, USA

T. Gojobori, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Saudi Arabia

Executive Editors:

S. Chuva de Sousa Lopes, Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), 2300 RC, Leiden, Netherlands

A.M. Engel, Dept. of Epidemiology, Tulane Cancer Center, Tulane University, 1430 Tulane Avenue, New Orleans, Louisiana, LA 70112-2699, USA

J. Messing, Waksman Institute, Rutgers University, 190 Frelinghuysen Road, Piscataway, New Jersey, NJ 08854, USA

J. Pratap, Department of Anatomy and Cell Biology, Rush University Medical Center, 1750 W. Harrison - 1409B, Jelke Southcenter, Chicago, Illinois, IL 60612, USA

A.P. Rooney, National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), 1815 N University St, Peoria, Illinois, IL 61604-3999, USA

A. Rynditch, Dept. of Molecular Oncogenetics, Inst. of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian National Academy of Sciences (NAS), 150 Zabolotnoho str., 03143, Kiev, Ukraine

C. Vieira-Heddi, Bât. Grégor Mendel, UMR CNRS 5558 - LBBE, Université Claude Bernard - Lyon I, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne, France

Review Editor

D. Petrovič, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Gene Wiki Editors:

E.A. Golemis, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA
I. Hanukoglu, Ariel University, Ariel, Israel

A. Su, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

G. Tsueng, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

K.W.S. Tsui, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Associate Editors:

T.V.S. Ahluwalia, Copenhagen University Hospital, Gentofte, Denmark

W.Y. Almawi, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

S. Arhondakis, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens, Greece

G. Ash, Charles Sturt University, Wagga Wagga, New South Wales, Australia

- N. Azarpira**, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran S. Baksh, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- A. Barat**, Indian Council of Agricultural Research (ICAR), Bhimtal, India M. Barucca, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy
- O.F. Bayrak**, Yeditepe University, Istanbul, Turkey B. Bayram, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Turkey S. Bayram, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey
- V.P. Belancio**, Tulane University, New Orleans, Louisiana, USA
- S.R. Bhaumik**, Southern Illinois University at Carbondale, Carbondale, Illinois, USA
- G. Blanck**, University of South Florida (USF) College of Medicine, Tampa, Florida, USA
- J. Blasiak**, University of Łódź, Lodz, Poland
- K. Blyth**, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Scotland, UK
- C. Bonin**, Hampton University, Hampton, Virginia, USA
- H.E. Boudreau**, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA
- M.A. Buchheim**, University of Tulsa, Tulsa, Oklahoma, USA
- A. Canario**, Universidade do Algarve (UAlg), Faro, Portugal
- F. Caradonna**, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy
- A. Charest**, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, USA
- E.S. Chen**, National University of Singapore, Singapore, Singapore
- M. Chen**, Nanyang Technological University, Singapore
- B. Chénais**, Université du Maine, LE MANS CEDEX 9, France
- Y. Cheng**, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California, USA
- T.-Y. Chiang**, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
- H. Chung**, National Institute of Animal Science (NIAS), Suwon, The Republic of Korea
- O. Coqueret**, Université d'Angers, Angers, France
- J. Davie**, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
- R. Davoli**, Università di Bologna, Bologna, Italy
- D.R. Deyle**, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
- Y. Dodurga**, Pamukkale Üniversitesi, Kınıklı/DENİZLİ, Turkey
- C.-H. Dong**, Qingdao Agricultural University, Qingdao, China
- C. Dunlap**, National Center for Agricultural Utilization, Peoria, Illinois, USA
- R.J. Duronio**, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- E. Emekli-Alturfan**, Marmara University, Istanbul, Turkey
- V. Fotopoulos**
- G. Francisco**, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil
- X. Graña**, Temple University School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- J.-F. Gui**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Wuhan, China
- X. Guo**, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong, China
- N. Hakooz**, University of Jordan, Amman, Jordan K. Han, Dankook University, Chungnam, The Republic of Korea
- M. Hansen**, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, USA
- L.M. Haupt**, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia
- J.R. Hawse**, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
- J. He**, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, China S.W. Herke, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA
- R.J. Herrera**, Florida International University, Miami, Florida, USA
- Y. Hong** R. Hooft van Huijsduijnen, Bernex, Switzerland
- L. Hou**, Liaoning Normal University, Ganjingzi District, Dalian city, China
- Z. Hu**, Nanjing Medical University, Nanjing, China
- G. Itirli Aslan**
- K. Ito**, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

M. Ivshina, UMass Medical School, Worcester, Massachusetts, USA
L.M. Iyer, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA
M. Janitz, UNSW Australia, Sydney, New South Wales, Australia
D. Jerry, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia
Y. Jiang, Shandong Agricultural University, Taian, China
E.T. Johnson, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois, USA
I. Kalajzic, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, USA
H.B.J. Karperien, University of Twente, Enschede, Netherlands
A. Keller, Am Hubland, Würzburg, Germany
H.-S. Kim, Pusan National University, Busan, The Republic of Korea
U. Kim, Kyungpook National University, Daegu, The Republic of Korea T.S. Kovacs, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
K. Blyth, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Scotland, UK
E. Kovesdi, University of Pécs (Pécsi Tudományegyetem), Pécs, Hungary
D.A. Kramerov, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russian Federation
N. Kumar, Central University of Bihar, Bihar, India
R. Kumar, IIT Madras, India V.K. Kutala K. Larsen, Aarhus University, Slagels, Denmark
L. Lasagni, Università degli Studi di Firenze, Florence, Italy
C.P. Leaw, University of Malaya, Bachok, Kelantan, Malaysia
J.-H. Lee, Chungnam National University, Yuseong Gu, Daejeon, The Republic of Korea
J.-S. Lee, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon, The Republic of Korea
C. Lei, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China
C.J. Lengner, University of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA
C. LePoole, Loyola University Medical Center, Maywood, Illinois, USA
E.A. Lewallen, Hampton University, Hampton, Virginia, USA
B. Li S. Li, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA
C.M. Lill, Universität zu Lübeck, Luebeck, Germany
L. Ling, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore, Singapore H.
Liu J.-H. Liu, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China
X. Liu, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China
Y.-P. Liu, Sichuan Agricultural University, Sichuan, China
R. Mahfouz, American University of Beirut (AUB), Beirut, Lebanon
A. Maran, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA
L. Mariño-Ramírez, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA J. Martinez, Universidad de Chile
E. Mirkin, Tufts University, Medford, Massachusetts, USA
R. Mittal
R.H. Mohamed, Zagazig University, Zagazig, Egypt
J. Momand, California State University at Los Angeles, Los Angeles, California, USA
C. Murgatroyd, Manchester Metropolitan University, Manchester, England, UK
I. Nanda, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany
J. Neil, University of Glasgow, Glasgow, UK
N. Normanno, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Naples, Italy
M. Osato, National University of Singapore, Singapore, Singapore
C. Perez, Universidad de Chile, Santiago 7, Chile
S. Pervaiz, National University of Singapore, Singapore, Singapore
D.G. Peterson, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, USA

- Jean-François Picimbon, J. Fu** (Chinese Name), QILU University of Technology, Jinan, Shandong Province, China
- O. Piontkivska**, Kent State University, Cleveland, Ohio, USA
- M. Plohl**, Institute Rudjer Boskovic, Zagreb, Croatia
- J.N. Post**, University of Twente, Enschede, Netherlands
- F. Quondamatteo**, University of Glasgow, Glasgow, UK
- J.L. Ramirez**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Peoria, Illinois, USA
- D. Ray**, Texas Tech University, Lubbock, Texas, USA
- S.V. Razin**
- M. Rijavec**
- I. Rogozin**, National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, USA
- S.R. Rutherford Siegel**, Penn State University College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA
- H.-M. Ryoo**, Seoul National University (SNU), Seoul, The Republic of Korea
- S. Saccone**, University of Catania, Catania, Italy
- H.-J. I. Sampen**, Jesse Brown Veterans Affairs Medical Center, Chicago, Illinois, USA
- B. Senthilkumaran**, University of Hyderabad, Hyderabad, India
- E. Seto**, George Washington University, Washington, Washington, USA
- W. Shen**, Qingdao Agricultural University, Qingdao, China
- M.B. Soares**, University of Illinois College of Medicine, Peoria, Illinois, USA
- J. Somarelli**, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- S. Song**, Peking University Health Science Center, Beijing, China
- M. Spiroski**
- J.A. Squire**, Queen's University at Kingston, Kingston, Ontario, Canada
- R. St. Arnaud**, McGill University, Montreal, Quebec, Canada S. Stifani, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
- V. Streva**, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts, USA Y. Suzuki, Nagoya City University, Aichi-ken, Japan
- M. Switonski**, Poznań University of Life Sciences, Poznan, Poland
- H. Taipaleenmäeki**, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
- T. Tanaka**, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan
- I. Taniuchi**, RIKEN Advanced Science Institute, Yokohama City, Kanagawa, Japan
- J. Tapia**, Universidad de Chile, Santiago 7, Chile
- V. Teplyuk**, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA
- Q.-B. Tian**, Hebei Medical University, Shijiazhuang, China
- S. Tural**
- F. Ucar**, Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey K. Usdin, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA
- J. van der Oost**, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands M. van Noesel, Erasmus MC: Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Rotterdam, Netherlands
- A. Varriale**, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli, Italy
- A. Villagra**, University of South Florida (USF) College of Medicine, Tampa, Florida, USA
- A.M. Viñas Díaz**, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
- D.C. Voon**, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa, Japan
- B. Williams**, Van Andel Institute, Grand Rapids, Michigan, USA
- M. Wolf**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany
- K. Wright**, H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, Florida, USA
- P. Xu**, Xiamen University, Xiamen, China M. Yang, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China
- W.-X. Yang**, Zhejiang University, Hangzhou, China

Z.M. Yang, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China
H. Ye, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenzhen, China
B. Zhang, East Carolina University, Greenville, North Carolina, USA
Y. Zhang, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA
Y. Zhang, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China
Z. Zhao, Southwest University, Beibei, Chongqing, China
H. Zhou, Lincoln University NZ, Lincoln, New Zealand
Y. Zhou, Soochow University, Suzhou, China

Founding/Honorary Editor:

W. Szybalski, University of Wisconsin Medical School, Madison, Wisconsin, USA

Former Editors-in-Chief

G. Bernardi, Università di Roma Tre, Rome, Italy

M.A. Batzer, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

[GENE] has an open access mirror journal, [GENE: X].

Before preparing a paper for submission to *Gene*, the author(s) should carefully read these instructions, and *Gene's List of Abbreviations*, thus avoiding needless delays during the editorial process. Papers should be carefully prepared in *Gene's* style. When a paper is submitted to *Gene*, the corresponding author is responsible for all authors having seen and approved the original paper and, eventually, the proofs.

The paper should be accompanied by a Cover Letter, in which the authors are invited to suggest the names of two editorial board members who could serve as Handling Editor. Authors will also need to supply the names of eight potential referees (as well as their affiliations, e-mail addresses and areas of expertise). In order to ensure a maximum of objectivity, the names of scientists the authors do not wish to be consulted in the reviewing process can also be provided, as well as any other special requests.

Gene requires all new nucleotide and amino acid sequences to be deposited. Obtain and include an accession number with all sequences. The most convenient method for submitting sequence data is by World Wide Web:

[EMBL](#)

[GenBank](#)

[DDBJ](#)

Alternatively, the stand-alone submission tool "Sequin" is available from NCBI.

If requested the database will withhold release of data until publication.

If references are quoted as 'In press', the relevant manuscript(s) should also be attached. Should authors be requested by the Editor to modify the text prior to publication, the revised version should be submitted within 2 months. After this period, the manuscript will be dealt with as a new one.

Speed of Peer Review

All possible effort will be made by the Editors in order to obtain referees' comments rapidly. In principle, the authors will be informed of a decision within 6 weeks.

Types of paper

All reports should explicitly state the biological relevance of the function that is the subject of the paper.

Methods papers will be considered only if they are of general importance with considerable original and useful information. Minor improvements to existing methods are not acceptable.

Letters to the Editor that are pertinent to material published in GENE or that discuss problems of general interest are selected for publication. The author of a paper in question is usually given an opportunity to reply.

Reviews or Mini-reviews are generally solicited by the Editors of the journal. However, prospective authors interested in contributing such a paper are invited to contact the Editor-in-Chief.

Gene Wiki Reviews are invited reviews published under a dual publication model. Invited authors submit gene-specific review articles and update the corresponding Wikipedia pages. To contribute to this series, please FIRST contact the editors to verify the proposed gene(s) qualify for the series and to receive an invitation.

Please note that only the final paper should be uploaded to Editorial System. Any request to incorporate changes to the paper after submission will not be considered.

Contact details for submission

Papers should be submitted to Gene's online submission system, <http://ees.elsevier.com/gene/>. A PDF file comprising all text and figures is acceptable for initial submission. When submitting a revised manuscript, separate electronic files are required. For questions on the submission and reviewing process, please contact the Editorial Office at gene@elsevier.com.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)

- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

Changes to authorship

Please enter details of all Authors who contributed to the work reported in the manuscript based on their seniority and contribution. The corresponding author of the paper must be indicated in the paper. All communication regarding this submission will be sent to the person who is selected as the Corresponding Author during submission. Please note that we will not be able to make any changes to the author names (adding/removing authors, change of order of authors) after the paper is accepted and moved to typesetting. In case of any queries please contact Gene@elsevier.com before completing the submission.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open Access

Authors wishing to publish open access can choose to publish open access in [GENE: X] [[https:// www.journals.elsevier.com/gene-x](https://www.journals.elsevier.com/gene-x)], the open access mirror journal of [GENE]. One, unified editorial team manages the peer-review for both titles using the same submission system. The authors choice of publishing model will determine in which journal, [GENE] or [GENE:X], the accepted manuscript will be published. The choice of publishing model will be blinded to referees, ensuring the editorial process is identical.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Referees

Please submit the names, institutional affiliations, and e-mail addresses of eight (8) potential referees, as well as a brief description of their expertise relevant to your manuscript. Suggested reviewers should be individuals qualified to evaluate the work you have submitted. The reviewers suggested may not be current, recent or extensive collaborators of yours, and cannot have been involved in the preparation of the manuscript. Reviewers must not be members of the same institution as the authors. Members of GENE's Editorial Board are generally not available as reviewers, and should not be named as suggested reviewers.

Please note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. Failure to provide appropriate reviewer suggestions may result in your manuscript being returned to you without being reviewed.

Authors may request exclusion of certain referees if conflicts of interest are anticipated. However, no more than 3 such names should be given. Entire groups or institutions cannot be specified for exclusion.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Abbreviations

Consult [Gene's List of Abbreviations](#) and the pertinent literature for accepted abbreviations, especially for genes and proteins; list all those used, even if already in Gene's list (create new abbreviations if necessary). Be meticulous with symbols. For proteins, use Roman letters with at least the first letter capitalized (e.g., Hprt, HPRT or β Gal) for genes (or DNA) use italicized letters (e.g., lacZ, hprt, HPRT or cat gene, not HPRT or CAT gene). Consult the nomenclature (or usage) for the particular organism concerned to use (or create) proper gene/protein abbreviations.

Please note that the instructions related to Abstract, Keywords & Math formulae still apply to all new submissions.

The journal does not publish patient photographs except as Supplementary Information. These images should be replaced within the article with diagrams of an idealized human form indicating any phenotypic abnormality.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. The Results and Discussion sections should refer to the data shown in the figures and tables, and briefly discuss their significance. Divide these sections into numbered subsections with short subtitles (lower-case, Roman, not underlined). Where the Results section is combined with the Discussion section, the last subsection, subtitled Conclusions, should be short and divided into points.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Use only words not already present in the title.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

The journal does not publish patient photographs except as Supplementary Information. These images should be replaced within the article with diagrams of an idealized human form indicating any phenotypic abnormality.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Only if a laser-quality printer is not available (dot matrix printers are unsatisfactory) should you present professionally drawn figures in black ink on white paper. Always use large and bold lettering and heavy smoothlines to permit photographic reduction. Ensure that all symbols in the figure are large and match the explanations in the legend. Sequence figures should be either 60 nucleotides (or amino acids) in width (to fit into a single printed column), or 120-150 nt. As a rule no more than a single page is allowed for sequence figures. Add bp, nt, kb or kDa symbols above the numerals in marker lanes. Legends should be typed/printed double-spaced, on pages separate from the figures themselves. The maximum size of figures is A4: present larger figures on two or more sheets.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source

publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language](#) styles, such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/gene>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Duncan, C.C., Kosmidis, M.K., Mirsky, A.F., 2005. Closed head injury-related information processing deficits: An event-related potential analysis. *Int. J. Psychophysiol* 58, 133-157 Bure , J., Bure ov , O., Huston, J.P., 1983. Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior, 2nd edn., Elsevier, Amsterdam, 326 pp. Swaab, D.F., 1982. Neuropeptides. Their distribution and function in the brain. In: Buijs, R.M., P vet, P., Swaab, D.F. (Eds.), *Chemical Transmission in the Brain. The Role of Amines, Amino Acids and Peptides*, Progress in Brain Research, Vol. 55, Elsevier, Amsterdam, pp. 97-122. [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on

ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your

data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).