



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS REALEZA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

DIANA PAULA PERIN

**OCORRÊNCIA SIMPÁTRICA DE TRÊS CARIOMORFOS DE *Hoplias malabaricus*
PARA A REGIÃO DO BAIXO RIO IGUAÇU, REALEZA, PARANÁ.**

REALEZA

2019

DIANA PAULA PERIN

**OCORRÊNCIA SIMPÁTRICA DE TRÊS CARIOMORFOS DE *Hoplias malabaricus*
PARA A REGIÃO DO BAIXO RIO IGUAÇU, REALEZA, PARANÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Dalila Moter Benvegnú

Co-orientador: Prof^o Dr. Roberto Laridondo Lui

REALEZA

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Perin, Diana Paula

Ocorrência simpátrica de três cariomorfos de *Hoplias malabaricus* para a Região do Baixo Rio Iguaçu, Realeza, Paraná. / Diana Paula Perin. -- 2019.

28 f.:il.

Orientadora: Doutora Dalila Moter Benvegnú.

Co-orientador: Doutor Roberto Laridondo Lui.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Ciências Biológicas-Licenciatura, Realeza, PR, 2019.

1. Espécies exóticas. 2. Citogenética. 3. Distribuição geográfica. 4. Traíra. I. Benvegnú, Dalila Moter, orient. II. Lui, Roberto Laridondo, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Diana Paula Perin

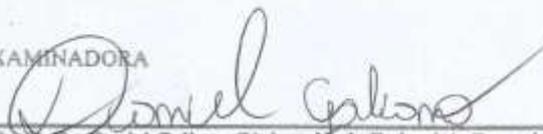
Ocorrência simpátrica de três cariomorfo de *Hoplias malabaricus* para a região do Baixo Rio Iguaçu, Realeza, Paraná

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas - Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza - PR, como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

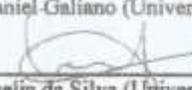
Orientador: Prof^a Dra Dalila Moter Benvegnú
Co-Orientador: Dr. Roberto Laridondo Lui

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela „banca“ em: 13/11/2019

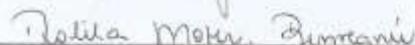
BANCA EXAMINADORA



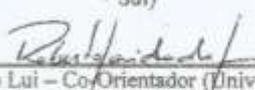
Prof. Dr. Daniel Galiano (Universidade Federal da Fronteira Sul)



Prof. Dra. Maelin da Silva (Universidade Estadual de Ponta Grossa)



Prof. Dra Dalila Moter Benvegnú - Orientadora (Universidade Federal da Fronteira Sul)



Prof^o Dr Roberto Laridondo Lui – Co-Orientador (Universidade Estadual do Oeste do Paraná)

Dedico este trabalho aos meus pais, Eloi Perin e Rosane Maria Nalin e a minha irmã Edivani Perin [...] que às vezes não me entenderam, mas me incentivaram a fazer tudo o que eu quis, mesmo não concordando. Agora percebo que é necessário muito amor para fazer isso.

(PARR, Tod. O livro da família. Panda Books, 2003).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha família pelo apoio ao longo dos cinco anos da graduação, em especial aos meus pais, minha irmã e meu cunhado que não mediram esforços para me ajudar em todos os momentos, emocional, física e financeiramente. Tenho sorte em ter essa família unida, que me acompanha e me apoia em minha carreira acadêmica. Sou privilegiada por vocês estarem comigo ao longo dessa caminhada, e pelo apoio e incentivo em estudar as traíras, em demonstrarem interesse nesta pesquisa, em virem me assistir apresentando este trabalho. Obrigada pai por ter me ensinado desde pequena sobre peixes e por sempre me apoiar, obrigada mãe por ser essa pessoa tão amável e mana, obrigada por cada palavra e por todo seu apoio, você é a melhor irmã, minha companhia mais agradável. Amo imensamente vocês.

Além disso, gratidão a Me. Denise Feliceti e Prof^a Msc. Luciana Borowski Pietricoski. A aventura de vocês por essa área de estudo de traíras e início deste trabalho em 2015 foi o que abriu as portas para mim estar onde estou. Agradeço imensamente por todo apoio e oportunidades. Admiro muito vocês e sou imensamente grata por tudo.

Aos meus orientadores, professora Dr^a Dalila Moter Benvegnú que sempre me apoiou e se tornou minha mãe científica, vou levar você em meu coração por toda vida. Agradeço por tudo o que aprendi ao longo dos últimos anos sendo sua orientada. Você é uma mulher incrível que sempre me inspirei. E ao professor Dr. Roberto Laridondo Lui, que aceitou o convite de me orientar, mesmo a distância, sendo alguém tão compreensivo, que vê o meu melhor, vê meus progressos e ajuda a melhorar nos pontos que é necessário. Obrigada professor por me acolher como orientada sua e me auxiliar em todas idas a Cascavel. Vocês dois sempre serão profissionais que eu admirarei imensamente e me inspirarei!

À toda família que construí em Realeza. Vocês são inesquecíveis e tornaram minha caminhada por essa cidade mais leve e agradável. Agradecimento especial a Alifer Palhano, Andressa Masetto, Sandieli Bianchin, Janaíne Perin, Maiara Beitum, Germano Rodrigues da Silva, Elizandra dos Santos, Debora Cristina Pereira e Cláudia Maleski, obrigada por terem sido meus incentivadores ao longo dos últimos anos, eu amo muito vocês.

Agradeço também a Universidade Federal da Fronteira Sul a minha casa, nossa universidade pública, federal e gratuita, conquistada por movimentos sociais, obrigada a cada um que lutou para essa universidade estar aqui. Agradecimento pelo apoio no

desenvolvimento deste trabalho, estendendo a gratidão à estrutura e profissionais presentes nesta instituição, aos técnicos de laboratório, em especial a Ana Paula Moraes Dutra pelo auxílio nas atividades do laboratório e aos professores desta instituição, os quais estiveram presentes no meu processo formativo na área de Ciências Biológicas - Licenciatura, obrigada a cada professor que esteve presente nesta caminhada pela graduação, em especial a Dra. Gilza Maria de Souza Franco, Dr. Daniel Galiano e Dra. Maelin Silva pela parceria nos últimos anos e por aceitarem ser bancas deste trabalho e também por todo apoio ao longo da graduação.

Também quero deixar registrado meus agradecimentos a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Cascavel, em especial aos laboratórios de Genética e Citogenética, pela estrutura cedida para o desenvolvimento da maior parte desta pesquisa. O trabalho não estaria tão lindo se não fosse o apoio de vocês. Destacando o agradecimento primeiramente ao Dr. Leonardo Marcel Paiz por toda paciência em me ensinar, pelas conversas e todo apoio, também aos pesquisadores Dr. Vladimir Margarido, Me. Mariane Gavazzoni e Dra. Maelin da Silva, grata pelo apoio! Além disso, a Amanda de Souza Machado e Samantha Kowalski por me auxiliarem no laboratório e me receberem em suas casas em minhas idas a Cascavel, obrigada! E gratidão a todos pela paciência com o nitrato de prata.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton).

RESUMO

A bacia do Rio Iguaçu é dividida em Alto, Médio e Baixo Iguaçu, nascendo na Serra Geral e com Foz nas cataratas do Iguaçu, uma importante barreira geográfica que separa a bacia do Rio Iguaçu e a bacia do Rio Paraná. A ictiofauna da bacia do Rio Iguaçu é muito diversa, com alto grau de endemismo, com cerca de 70% das espécies de peixes endêmicas. Entre as oito ordens de peixes encontradas nesta bacia, as mais representativas em número de espécie são Siluriformes, Characiformes e Perciformes. Dentre os Characiformes, a família Erythrinidae possui três gêneros, sendo um deles o gênero *Hoplias*, composto por duas espécies, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*. *Hoplias malabaricus* é popularmente conhecida como traíra, considerado morfologicamente como uma única espécie biológica, porém com diferenças cromossômicas interpopulacionais que mostram a existência de pelo menos sete espécies dentro do grupo, os chamados cariomorfos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar populações de *H. malabaricus* presentes no Rio Capanema, região de Realeza, Paraná, na porção final da Bacia do baixo Rio Iguaçu. Para este trabalho, os espécimes foram coletadas e mantidas em aquários aerados n laboratório de Genética, na UNIOESTE, *Campus* Cascavel. Realizou-se a estimulação de mitoses por meio de leveduras, com aplicação de colchicina para inibição dos fusos mitóticos, seguido de overdose por óleo de cravo e extração do rim para obtenção dos cromossomos metafásicos. O preparo das lâminas foi feito através de análise sequencial com Giemsa, seguido pelo bandamento C para identificação das regiões de heterocromatina constitutiva. Os resultados mostram que há a presença de três cariomorfos de *H. malabaricus* na região de estudo, sendo eles Cariomorfo A, com $2n=42$, sem cromossomos sexuais aparente e fórmula cariotípica $26M + 16SM$, para machos e fêmeas; Cariomorfo B, com número diploide de 42 cromossomos e sistema de cromossomos sexuais simples, XX/XY e fórmula cariotípica $24M+16SM+2ST$ para as fêmeas e $23M+18SM+1ST$ para os machos; e o cariomorfo D, apresentando $2n=39$ cromossomos para machos ($23M+16SM$) e $2n=40$ cromossomos nas fêmeas ($20M+20SM$) e sistema de cromossomos sexuais complexo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. O cariomorfo A é considerado natural para a bacia do Iguaçu, enquanto o cariomorfo B possui descrição apenas para um sistema lacustre do Vale do Rio Doce, para a porção do Alto Rio Iguaçu e para o Alto Paraná. Já o cariomorfo D é endêmico da região do Alto Rio Paraná, sendo esta a primeira descrição da presença do cariomorfo D em outra bacia, representando assim uma nova região de ocorrência do cariomorfo D. Nossa hipótese é que a presença destes cariomorfos nesta região ocorre por influência antrópica, por meio da compra e venda de alevinos de outras regiões os quais podem ter sido trazidos para estações de pesca desta região e migrado para os rios durante épocas de enchente. Dessa forma, a implantação de cariomorfos exóticos pode alterar a biodiversidade local, visto que alguns cariomorfos são mais agressivos que outros, além de haver disputa por alimento e território entre os diferentes cariomorfos.

Palavras chave: Espécies exóticas; Citogenética; Distribuição geográfica; traíra.

ABSTRACT

The Iguaçu River Basin is divided into Upper, Middle and Lower Iguaçu, born in the Serra Geral and with Foz in the Iguazu Falls, an important geographical barrier that separates the Iguaçu River basin from the Paraná River basin. The ichthyofauna of this basin is very diverse, with a high degree of endemism, with about 70% of endemic fish species. Among the eight orders of fish found, the most representative in number of species are Siluriformes, Characiformes and Perciformes. Among the Characiformes, the family Erythrinidae has three genera, one of them the genus *Hoplias*, composed of two species groups, *Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*. *Hoplias malabaricus* is a species of fish, popularly known as traíra, considered morphologically as a single biological species, but with interpopulational chromosomal differences that show the existence of at least seven species within this group, called karyomorphs. The aim of this work is to analyze populations of *Hoplias malabaricus* present in the Capanema River, in Realeza, Paraná, in the final portion of the lower Iguaçu River. For this work, the specimens were collected and kept in aerated aquariums. Mitoses were stimulated by yeast, colchicine was applied to inhibit mitotic spindles, followed by clove oil overdose and kidney extraction to obtain the metaphase chromosomes. Slide preparation was performed by sequential analysis with Giemsa, followed by C-banding to identify constitutive heterochromatin regions. The chromosomes were classified into Metacentric, Subcentric, Subtelocentric or Telocentric and arranged in homologous pairs. The results show that there is the presence of three *H. malabaricus* karyomorphs in the study region, which are Karyomorph A, with $2n = 42$ chromosomes, without apparent sex chromosomes and $26M + 16SM$ karyotype formula, for males and females; Karyomorph B, with diploid number of 42 chromosomes and a simple sex chromosome system, XX / XY and karyotypic formula $24m + 16sm + 2st$ for females and $23m + 18sm + 1st$ for males; and karyomorph D, with diploid number 39 chromosomes in male ($23m + 16sm$) and 40 chromosomes from female ($20m + 20sm$) and complex sex chromosome system $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$. Karyomorph A is considered natural for the Iguaçu basin, while karyomorph B is described for a lacustrine system in the Rio Doce valley and for the Upper Iguaçu River and Upper Paraná. Karyomorph D is endemic to the Upper Paraná River region, which is the first description of the presence of karyomorph D in another basin, thus representing a new region of occurrence of karyomorph D. Our hypothesis is that the presence of these karyomorphs in this region occurs by anthropic influence through the purchase and sale of fingerlings from the Upper Paraná River region which may have been brought to the fishing stations of this region and migrated to the rivers during times of flooding. Thus, the implantation of exotic karyomorphs can alter local biodiversity, as studies have shown that some karyomorphs are more aggressive than others, and there is a dispute for food and territory between different karyomorphs.

Keywords: Exotic species; Cytogenetics; Geographic distribution.

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados	15
4. Discussão.....	20
Referências bibliográficas	23

O artigo apresentado a seguir segue as normas da revista Biota Neotropica, com as normas disponíveis no link <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/instruction>

Ocorrência simpátrica de três cariomorfos de *Hoplias malabaricus* para a Região do Baixo Rio Iguaçu, Realeza, Paraná.

Diana Paula Perin¹, Denise Felicetti², Leonardo Marcel Paiz², Luciana Borowski Pietricoski¹; Roberto Laridondo Lui², Dalila Moter Benvegnú^{1,2}

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Cascavel*

Autor para correspondência: roberto.lui@unioeste.br

Resumo

A bacia do rio Iguaçu possui como característica principal a presença de várias barreiras geográficas, destacando as Cataratas do Iguaçu e diversas outras quedas d'água e corredeiras que tornam este um rio de alto grau de endemismo. Dentre as espécies de peixes encontradas nesta bacia destaca-se o peixe da família Erythrinidae *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecido como traíra. Este é um peixe com dificuldade na sua classificação taxonômica e necessidade de revisão, visto que é um complexo de espécies crípticas, morfologicamente semelhantes, porém com diferenças cromossômicas interpopulacionais sinalizando a existência de sete espécies distintas dentro deste grupo, classificadas em cariomorfos de A a G. Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo identificar quais cariomorfos de *H. malabaricus* estão presentes na porção final da bacia do Baixo Rio Iguaçu, no Rio Capanema, em Realeza (PR), local onde as populações não foram analisadas do ponto de vista citogenético. Foram realizadas técnicas de citogenética clássica sendo análise sequencial com Giemsa e identificação de regiões de heterocromatina constitutiva através do bandamento C. Os resultados mostram que há a presença de três cariomorfos em simpatria na porção do baixo do Rio Iguaçu, sendo eles, os cariomorfos A com 42 cromossomos (26m+16sm) sem sistema de cromossomos sexuais, o cariomorfo B com 2n= 42 com sistema de cromossomos sexuais XX/XY e fórmula cariotípica de 24m+16sm+2st para as fêmeas e 23m+18sm+1st para os machos e o cariomorfo D com número diploide 39 cromossomos para machos (23m+16sm) e 40 cromossomos nas fêmeas (20m+20sm) e sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y. O cariomorfo A é natural da bacia do Iguaçu, enquanto o cariomorfo B possui uma distribuição geográfica mais restrita, sendo encontrado em um sistema lacustre no Vale do Rio Doce (MG), no primeiro planalto paranaense (São José dos Pinhais) e no Alto Rio Paraná (Londrina), enquanto o cariomorfo D é considerado endêmico da Região do Alto Rio Paraná. A partir disso, sugerimos que a presença dos cariomorfos B e D ocorrem nesta região devido a introdução destes por influência antropogênica. Estas possíveis introduções podem afetar a biodiversidade local, visto que a introdução de espécies exóticas é um fator crucial na extinção de espécies nativas, pela disputa de alimento, ausência de predadores naturais e e no caso das traíras mais acentuadamente devido a agressividade, podendo influenciar na diversidade local.

Palavras chave: Espécies exóticas; citogenética; Distribuição geográfica; traíra.

1. Introdução

A bacia do rio Iguaçu formou-se durante o Cretáceo, entre 145 e 66 milhões de anos atrás (POTTER, 1997) Nasce na Serra Geral, na região do Planalto de Curitiba, com área de abrangência entre os três planaltos paranaenses, os quais dividem a bacia em três porções: Alto, Médio e Baixo Rio Iguaçu (SILVA et al., 2001). As altitudes ao longo desta bacia variam muito, sendo que no primeiro planalto os valores estão entre 800 a 1000 metros, e na sua foz no rio Paraná a altitude mínima chega a 80 metros (GEMI et al., 2014; SILVA et al., 2001). A porção do Baixo Rio Iguaçu, possui um derramamento basáltico ao longo de sua distribuição e é limitada do segundo planalto pela escarpa Triássico Jurássica e se estende até sua foz no rio Paraná (SILVA et al., 2001). Outra característica importante é a presença de quedas d'água nesta porção, como Salto Grande, Salto Santiago, Salto Osório e as Cataratas do Iguaçu com 13, 40, 30 e 72 metros respectivamente (MAACK, 1981), o que torna estas porções altamente endêmica. Além do mais, o soerguimento das Cataratas do Iguaçu, a cerca de 22 milhões de anos atrás, foi um dos fatores responsáveis pelo isolamento geográfico desta bacia e consequentemente o alto grau de endemismo (BAUMGARTNER, 2012, MDK/CENCO, 1987). A presença destas quedas d'água, e o desnível no terceiro planalto tem uma grande importância econômica para este trecho, gerando interesses voltados para produção de energia hidrelétrica. Porém, a construção de reservatórios para as usinas altera a biodiversidade local, sendo um dos fatores responsáveis pela extinção de espécies nativas (BAUMGARTNER, 2012).

A ictiofauna desta bacia é muito diversa, composta por 106 espécies descritas e com um alto número de espécies endêmicas, quase 70% do total de espécies de peixes da bacia (FROTA, 2016, BAUMGARTNER et al., 2012) e espécies indígenas não endêmicas com 30,3%, número que tem aumentado ao longo das últimas décadas. O alto número de espécies descritas nos últimos anos ocorre por dois motivos i) aumento de estudos ictiofaunísticos e, ii) aumento no número de espécies introduzidas na bacia. A introdução de espécies exóticas é um dos fatores responsáveis pela extinção de espécies nativas (VICARI et al., 2006, BAUMGARTNER et al., 2012). O livro vermelho da Fauna ameaçada de espécies do Paraná (PARANÁ, 2004) trás dados importantes sobre espécies de peixes endêmicos da bacia do Rio Iguaçu ameaçados de extinção, como *Cnesterodon carnejiei*, endêmico da região do Alto Paraná e espécies com distribuição altamente restrita a localidades específicas da bacia como *Austrolebias carvalhoi*, e *Cnesterodon omorgmotos* cuja principal ameaça é a urbanização no local de ocorrência destas espécies juntamente com a degradação do ambiente.

Dentre as espécies estudadas citogeneticamente no Rio Iguaçu são encontrados representantes de oito ordens e as com maior diversidade em número de espécie são os Siluriformes (46 espécies), seguida dos Characiformes (35 espécies) e Perciformes (11 espécies) (KANTEK et al., 2007, BAUMGARTNER, 2012). A ictiofauna do Baixo Rio Iguaçu é considerada de baixa riqueza e alto endemismo (DELARIVA, 2018) com cerca de 37% do total de espécies da Bacia do Iguaçu encontradas nesta porção. As famílias mais representativas são os Siluriformes e Characiformes (LARENTIS et al., 2016). Para os Characiformes, a família Erythrinidae compreende três gêneros, classificados morfologicamente em: *Hoplerythrinus*, *Erythrinus* e *Hoplias*. Na bacia do Rio Iguaçu são encontrados representantes dos gêneros *Erythrinus* e *Hoplias* (DINIZ; BERTOLLO, 2003; LARENTIS et al., 2016, BERTOLLO et al., 2000; KANTEK et al., 2007). O gênero *Hoplias* é composto por dois grupos, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*, conhecidos popularmente como traíras e trairão, respectivamente (OYAKAWA 1990, 2009). *Hoplias malabaricus* é um peixe carnívoro, sedentário, amplamente distribuído pelas principais bacias da América do Sul e com dificuldades para sua

classificação necessitando de revisão taxonômica. As traíras são comumente consideradas uma espécie biológica, porém existem diferenças cromossômicas interpopulacionais que as tornam um complexo de espécies crípticas, com sete cariomorfos distintos (BERTOLLO et al., 2000). As variações entre os cariomorfos vão desde o número de cromossomos, morfologia e sistema de cromossomos sexuais. E estudos apontam que a existência de barreiras pós-zigóticas impedem a reprodução entre os diferentes cariomorfos, sugerindo que são espécies diferentes. Estudos demonstram que, essas diferenças interpopulacionais nas traíras, são consequência de antigos eventos vicariantes (VICARI et al., 2006; GEMI et al., 2014).

De acordo com Vicari et al. (2006), o cariomorfo A de *H. malabaricus* é considerado como população natural da bacia do Rio Iguaçu. Porém, nessa bacia, têm-se descrições de dois cariomorfos, o A e o B, ambos apresentando $2n=42$ cromossomos, diferenciando-se entre si por um não apresentar sistema de cromossomos sexuais aparente (A) e outro com cromossomos sexuais simples, do tipo XX/XY (B). Para as populações analisadas na bacia do Rio Iguaçu, o cariomorfo A é encontrado no primeiro Planalto paranaense no município de Piraquara, no segundo Planalto em Poço Preto (BERTOLLO et al., 2000) e Palmeira (VICARI et al., 2003, 2005, 2006) e no Baixo Rio Iguaçu em Palmas (GEMI et al., 2014) e Nova Prata do Iguaçu (VICARI et al., 2006). Já o cariomorfo B é descrito apenas em São José dos Pinhais, no Alto Rio Iguaçu (LEMOS et al., 2002). Diversos estudos têm mostrado a simpatria entre diferentes cariomorfos de *H. malabaricus* e sem a existência de híbridos (DERGAM; BERTOLLO, 1990; BERTOLLO et al., 2000; PAZZA; JÚLIO-JR, 2003). Além do mais, estudos como o de Blanco et al. (2009), mostra a invasão de cariomorfos em regiões que não são de sua abrangência natural através de influências antrópicas, como a transposição do rio Piumhi, entre as bacias dos rios Paraná e São Francisco, no qual após esse evento houve invasão do cariomorfo A no rio São Francisco e dispersão do Citótipo F, natural do rio São Francisco para a região de transposição, povoando uma nova região de abrangência.

O baixo rio Iguaçu é um trecho, com intensas mudanças hidrográficas e influências antropológicas que alteram a ictiofauna local. Dentre estas alterações pode-se citar a construção de diversas hidrelétricas, introdução de espécies exóticas, atividades agropecuárias e urbanização nas margens da bacia. Tais alterações podem contribuir para a extinção de espécies nativas, somado ao alto endemismo dessa bacia pode causar a perda de espécies não apenas em escala local, mas global. Diante desse complexo cenário de alterações ambientais na região do baixo rio Iguaçu, este trabalho teve como objetivo analisar populações naturais de traíras no trecho final da porção Baixa da Bacia do Rio Iguaçu, onde não há dados publicados para *H. malabaricus*, buscando identificar os cariomorfos presentes a fim de progredir no conhecimento sobre a biodiversidade ictiofaunística relacionada a este grupo de peixes neste trecho da região Neotropical.

2. Material e Métodos

Foram coletados 15 indivíduos (sete machos e oito fêmeas) pertencentes ao grupo *Hoplias malabaricus*, do Rio Capanema, um dos afluentes da região do Baixo Rio Iguaçu, cidade de Realeza, Paraná. Para a coleta utilizou-se a liberação permanente do SISBio 31060-1 e do Comitê de Ética e Uso de Animais

(CEUA), realizada através da CEUA da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* Cascavel, (Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas da UNIOESTE: Protocolo 13/09 – CEEAAP/Unioeste). Os espécimes foram coletados, com o auxílio de redes de pesca e transportados até o laboratório de genética da UNIOESTE, *Campus* Cascavel, onde foram mantidos em aquários aerados. Foi realizada a estimulação de mitoses por meio de leveduras seguido de overdose por óleo de cravo (GRIFFITHS, 2000). A obtenção dos cromossomos mitóticos ocorreu segundo protocolo adaptado por Bertollo et al. (1978) e Foresti et al. (1993). Para a determinação da heterocromatina constitutiva, seguiu-se o método descrito por Sumner (1972) com adaptações sugeridas por Lui et al. (2012). Os cromossomos obtidos foram mensurados e classificados de acordo com a razão entre os braços (RB) em Metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) ou acrocêntricos (a), segundo Levan et al. (1964). Os cariótipos foram montados para a classificação dos citótipos de *Hoplias malabaricus* de acordo com Bertollo et al (2000).

3. Resultados

Dentro da amostra amostrados no Rio Capanema foram encontrados três cariomorfos vivendo em simpatria. Dos 15 indivíduos (sete machos e oito fêmeas), dois espécimes (um macho e uma fêmea) apresentaram $2n=42$, sem sistema de cromossomos sexuais, fórmula cariotípica com $26m+16sm$ para machos e fêmeas, e o bandamento C evidenciou regiões de heterocromatina constitutiva principalmente pericentroméricas e terminais (Fig. 1a, b), três indivíduos (dois machos e uma fêmea) analisados apresentaram $2n=42$ cromossomos, com sistema de cromossomos sexuais simples, do tipo XX/XY, fórmula cariotípica de $24m+16sm+2st$ para as fêmeas e $23m+18sm+1st$ para os machos, e o bandamento C evidenciando heterocromatina centromérica em todos os cromossomos e alguns blocos heterocromáticos terminais (Fig. 1c, d). 10 indivíduos (seis fêmeas e quatro machos) apresentaram $2n=39/40$ cromossomos para macho e fêmea, respectivamente, com os cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. A fórmula cariotípica para esta população é $20m+20sm$ para a fêmea e $23m+16sm$ para o macho (Fig. 1e, f). O bandamento C evidenciou regiões centroméricas em todos os cromossomos do complemento e teloméricas em alguns cromossomos, porém, além dessas características o cromossomo X_1 apresenta um largo bloco pericentromérico no braço longo e o cromossomo Y uma marcação intersticial no braço curto.

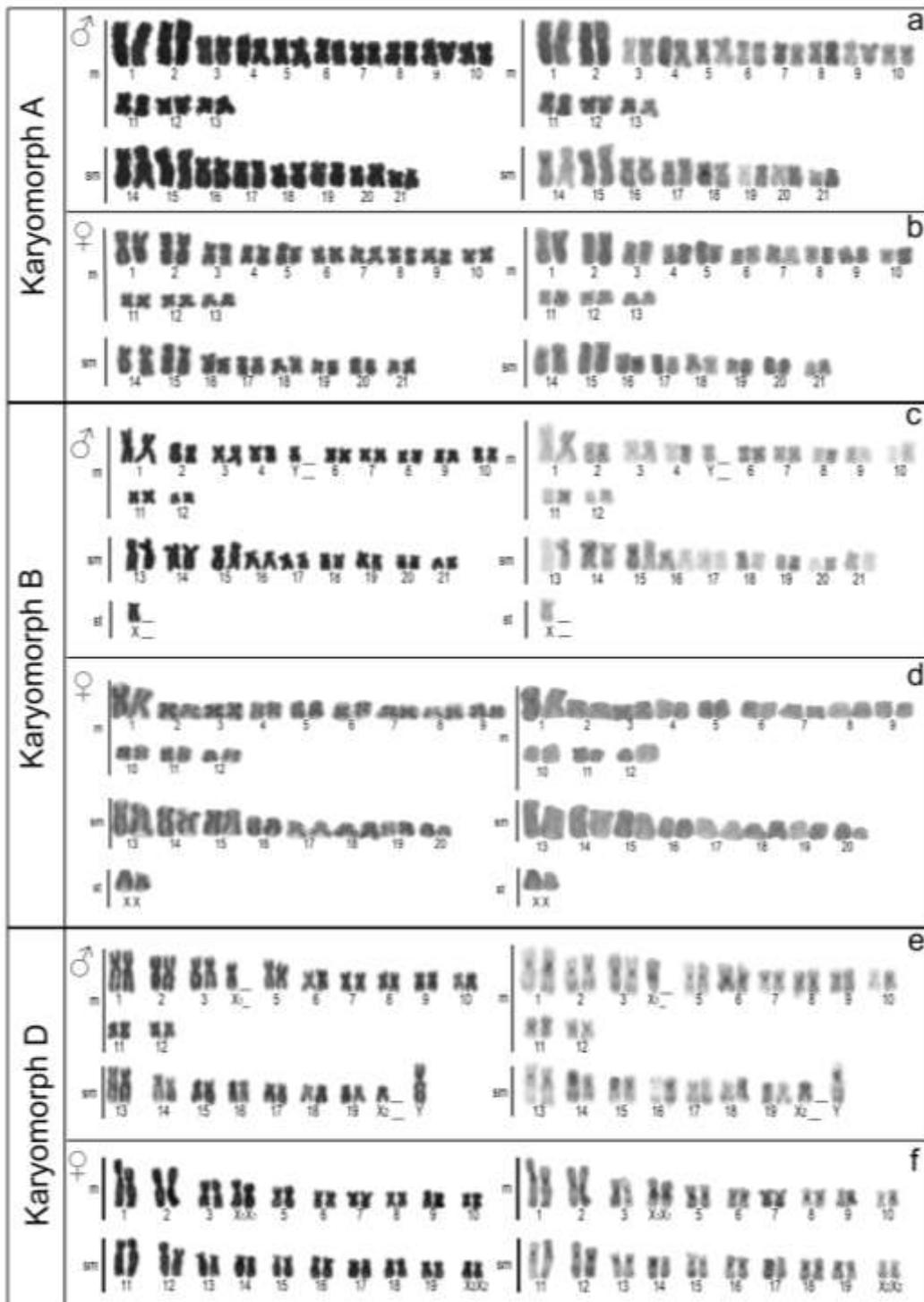


Figura 1. Cariótipos de *Hoplias malabaricus*, fêmea e macho pertencentes aos kariomorfos A (a; b), B (c; d) e D (e; f) corados com Giemsa e tratados através do bandamento-C.

Tabela 1. Cariomorfos de <i>Hoplias malabaricus</i> presentes na Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu.						
Localidade/ Bacia Hidrográfica	Cariomorfo/ Fórmula Cariotípica	AgRONS	Heterocromatina (Bandamento C)	18S rDNA	5S rDNA	Ref.
Piraquara (PR)/ Iguaçu	A/20m+22sm	Múltiplas: - 2 a 6 cromossomos (1 par bitelomérico)	Pericentromérica e intersticial			1
São José dos Pinhais (PR) / Iguaçu	B/24m+16sm+2st	Múltiplas	Pericentromérica			1
Poço Preto (SC) / Iguaçu	A/42 m-sm	-	-			2
Palmas (PR) / Iguaçu	A/24m+18sm	Múltiplas: - par 7, m, bitel - par 10, m, tel, bc	Pericentromérica e terminal	- par 4, m, bitel - par 7, m, bitel - par 10, m, tel, bc - par 13, sm, tel, bc - par 16, sm, int, bl - par 20, sm, bitel - par 21, sm, tel, bl	- par 8, m, int, bl - par 14, sm, int, bc	3
Nova Prata do Iguaçu (PR) / Iguaçu	A/24m+18sm	Múltiplas: - 3 a 8 cromossomos	Pericentromérica e terminal			4
Palmeira (PR) / Iguaçu	A/24m+18sm	Múltiplas: (2 a 7 cromossomos): - par 10, m, bitel - par 16, sm, int, bl - par 21, sm, tel, bl	Pericentromérica e terminal	- par 4, m, tel,bl - par 10, m, bitel - par 16, sm, int, bl - par 21, sm, tel, bl		4, 5, 6
Realeza PR/ Iguaçu	A/26M +16SM	-	Pericentromérica e terminal	-	-	7
Realeza PR/ Iguaçu	B/ 23M+18SM+1ST 23M+18SM+1ST	-	Pericentromérica e terminal	-	-	7
Realeza PR/ Iguaçu	D/ 23M+16SM 20M + 20 SM		Centroméricas e teloméricas. bl do X1 tem um largo bloco heterocromático no par X e no cromossomo Y chromosome, no bc.			

Tabela 1. Cariomorfos de *Hoplias malabaricus* ao longo da bacia do Rio Iguaçu.

Adaptado de Gemi et al(2014). PR: Estado do Paraná, Brasil; SC: Estado de Santa Catarina state, Brasil; m: metacentrico; sm: submetacentrico; tel: telomerica; bitel: bitelomérica; int: intersticial; bl: braço longo; bc: braço curto. Referências: (1) Lemos et al. (2002); (2) Bertollo et al. (2000); (3) Gemi et al (2014); (4) Vicari et al. (2006); (5) Vicari et al. (2003); (6) Vicari et al. (2005); (7) Presente artigo.

Tabela 2. Distribuição geográfica do cariomorfo D de *Hoplias malabaricus*.

Localidade/ Rio/ Bacia Hidrográfica	Fórmula cariotípica (Macho/Fêmea)	Ag RONS	Heterocromatina (Bandamento C)	18S rDNA	5S rDNA	Ref
São Carlos (SP)/ Corrego Monjolinho/ Alto Paraná	27M+12SM	Teloméricas.	Pericentroméricas e teloméricas. bl do par 5 mostra um bloco heterocromático nos machos e fêmeas.	Par 5, tel, bl - Par 13, tel, bl - Par 15, tel, bl - Par 19, tel, bl - Crom., X1 cent. -Crom. Y, int.	Par 2, tel, bl	1
	28M+12SM	Par 9 e 15				
	14M+25SM 14M+26SM	Múltiplas, teloméricas e centroméricas.				
São Carlos (SP)/ Reservatório Lobo/ Alto Paraná	27M+12SM	Múltiplas, teloméricas e biteloméricas.				2
	28M+12SM					
Reservatório Natural Jataí e Pirassunga (SP)/ Rio Moji-Guaçu/ Alto Paraná			Pericentroméricas e teloméricas. bl do par 5 mostra um bloco heterocromático em machos e fêmeas.	Par 12, tel, bl - Par 15, tel, la - Par 19, tel, bl - Par X1, peric. - Crom., Y, peric.	Par 5, int., bc Par 2, int Par 19, tel, bl	3
Rancho Alegre Lago Igapó, e Córrego Três Bocas, Londrina (PR); Bela Vista do Paraíso (PR); Jataízinho (PR), /Corrego Madalena e Rio Paranapanema/ Alto Paraná	14M+24SM+Y	Múltiplas e teloméricas (8 pares na fêmea e 7 pares no macho)	Pericentroméricas em todos os cromossomos, e em algumas regiões teloméricas	Par 5, tel, bl - Par 13, tel, bl - Par 15, tel, bl - Par 19, tel, bl - Crom. X1, int. - Crom., Y, bc	Par 2, tel, bl	4
	14M+26SM					
	12M+26SM+Y					
	12M+28SM					
Volta Grande (MG)/ Rio Grande/ Alto Paraná						5
Reservatório Jataí (GO)/ Rio Claro/ Alto Paraná						6
Londrina (PR)/ Ribeirão Três Bocas/Alto Paraná						7
Planície de inundação do Rio, Região de Porto Rico (PR)/ Rio Paraná/Alto Paraná	24M+15SM	Múltiplas e teloméricas				8
	24M+16SM					
Realeza (PR)/ Rio Capanema/ Baixo Guaçu	23M+16SM 20M + 20 SM		Centroméricas e teloméricas. bl do X1 tem um largo bloco heterocromático no par X e no cromossomo Y chromosome, no bc.			9

PR: Estado do Paraná, Brasil; SC: Estado de Santa Catarina, Brazil; MG: Estado de Minas Gerais, Brasil, SP: Estado de São Paulo, Brasil m: metacentrico; sm: submetacentrico; tel: telomericas; bitel: bitelomericas; int: intersticial; bl: braço longo bc: braço curto. 1. Dergam; Bertollo, 1990; Bertollo et al., 1997; Haaf et al., 1993;

Bertollo; Mestriner 1998; Bertollo et al., 2000; Cioffi; Bertollo, 2010; Cioffi et al, 2011a; Cioffi et al., 2011b; Oliveira et al., 2017, Dergam, 1996, Fereira; Bertollo; Martins 2007. 2. Bertollo; Takahashi; Moreira-Filho, 1983; Bertollo et al., 2000. 3. Bertollo et al., 1997; Bertollo; Mestriner 1998; Bertollo et al., 2000; Fereira; Bertollo; Martins 2007; Utsonomia et al., 2014. 4. Rosa et al., 2009 a; Rosa et al., 2009b; Cioffi, 2010. 5. Dergam 1996; Dergam et al., 2002. 6. Bertollo et al., 2000. 7. Bertollo et al., 2000. 8. Pazza; Júlio-Jr, 2003. 9. Este artigo

4. Discussão

4.1. Evolução cromossômica em *Hoplias*

Em classificação proposta por Bertollo et al. (2000), os sete cariomorfos de *H. malabaricus* são divididos em dois grandes grupos de acordo com o grau de parentesco evolutivo, o Grupo I que compreende os cariomorfos A, B, C e D e o Grupo II que é representado pelos demais. O cariomorfo A apresenta $2n=42$ cromossomos, sem sistema de cromossomos sexuais aparentes. O cariomorfo B também apresenta $2n=42$, com sistema de cromossomos sexuais simples (XX/XY) (LEMOS et al., 2002). O cariomorfo C possui $2n=40$ cromossomos meta/submetacêntrico. O cariomorfo D com 39 cromossomos para os machos e 40 para as fêmeas e sistema de cromossomos sexuais complexos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Enquanto no grupo II, o cariomorfo E apresenta $2n=42$, diferenciado do cariomorfo A e B pela presença de um par de acrocêntricos. Enquanto, o cariomorfo F possui $2n=40$ e por fim, o cariomorfo G possui $2n=40$ para as fêmeas e $2n=41$ para os machos, com um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY_1Y_2 .

Considerando a revisão dos cariomorfos, sugere-se que na porção do Baixo Rio Iguaçu, no Rio Capanema, são encontrados os cariomorfos A, B e D. O cariomorfo A apresentara fórmula cariotípica similar aos dados publicados para a bacia, porém com pequenas variações interpopulacionais, o que já é estabelecido pela literatura como característico deste grupo de peixes (GEMI et al., 2014). Segundo Da Rosa et al. (2014), cada cariomorfo apresenta um determinado número diploide e sistema de cromossomos sexuais fixo, enquanto o padrão de distribuição de heterocromatina e blocos GC-rico mostram diferenças interpopulacionais.

A maioria das populações do cariomorfo A no Rio Iguaçu apresentam $24m+18sm$ (GEMI et al, 2014, VICARI et al, 2003, 2005, 2006), sendo muito similar a estrutura cariotípica encontrada para este estudo. Ao comparar nossos resultados com demais trabalhos, a heterocromatina constitutiva apresenta pequenas variações interpopulacionais, porém com muita similaridade. Sugerimos que as pequenas diferenças na fórmula sejam divergências entre os autores, enquanto as diferenças entre os padrões de heterocromatina aparentemente, mesmo sendo pequenos representam variações interpopulacionais.

A população do cariomorfo B deste estudo, apresenta uma similaridade muito grande com o trabalho de Lemos et al (2002), com a mesma fórmula cariotípica e morfologia dos cromossomos semelhante e sem diferenças aparentes no padrão de heterocromatina constitutiva. Ao comparar com a população do Vale do Rio Doce, percebe-se que a estrutura cariotípica é muito similar, apresentando $22m+18sm+2st$ para a fêmea e $22m+19sm+1st$ para o macho, com pequenas variações no bandamento C, aparentemente representando divergências entre os autores. Observa-se que todas populações do cariomorfo B apresentam apenas um largo cromossomo metacêntrico e três maiores submetacêntricos, como pode-se observar na figura 1 “a” e “b” e nos trabalhos de Lemos et al (2002) e Cioffi et al (2010),

Enquanto as populações do cariomorfo D apresentam mais variações entre as populações na fórmula cariotípica, sendo que nenhum trabalho publicado até então, apresenta a mesma fórmula cariotípica da população analisada neste trabalho (Tabela 1), e ao comparar as fórmulas, a população que mais se assemelha a do presente

estudo é a encontrada na planície de inundação do Rio Paraná, Região De Porto Rico (PR), na porção do Alto Paraná. A distribuição de heterocromatina parece ser muito similar às populações da porção do Alto Rio Paraná, descritas em trabalhos anteriores. Ambas apresentando praticamente todos os cromossomos marcando na região centromérica, porém com algumas pequenas variações na distribuição da heterocromatina nos telômeros (UTSONOMIA et al., 2014, CIOFFI; BERTOLLO, 2010). Supomos que as variações interpopulacionais representem na maioria dos casos diferenças reais entre as populações do cariomorfo D. Além disso, no cariomorfo D, os cromossomos sexuais X_1 e Y apresentaram características próprias destes, sendo no cromossomo X_1 um largo bloco pericentromérico no braço longo e no Y uma marcação intersticial no braço curto, a qual é homóloga a região heterocromática constitutiva do X_1 (Tabela 1 e 2). Dessa forma, as mudanças cariotípica que ocorreram ao longo da evolução dos cariomorfo de *H. malabaricus* sugerem que este grupo possua uma plasticidade em relação a estas mudanças (DA ROSA, et al., 2014).

4.2. Biogeografia de *Hoplias malabaricus* na região Neotropical

As traíras são sedentárias, territorialistas e geralmente não ultrapassam grandes barreiras geográficas, o que favorece o isolamento geográfico de populações dentro de um mesmo rio ou bacias hidrográficas diferentes (BLANCO et al., 2010). Devido à ocorrência de eventos geológicos ao longo dos milhares de anos, populações deste peixe foram isoladas ao longo do sistema hidrográfico da América do Sul, resultando em especiação alopátrica e conseqüentemente no surgimento dos diferentes cariomorfos. Acredita-se que o isolamento geográfico das populações de traíras date do Pleistoceno, período entre 2,6 milhões e 11,6 mil anos atrás (BLANCO et al., 2010, DA ROSA et al., 2014). Da Rosa et al (2014) sugerem que o cariomorfo plesiomórfico de *H. malabaricus* seja o F, visto que este cariomorfo predomina nas bacias costais do atlântico, onde autores sugerem que seja um componente biogeográfico ancestral de surgimento de vários grupos de peixes (RIBEIRO, 2006). Além disso, a simpatria entre cariomorfos de *H. malabaricus* já é bem estabelecida pela literatura (LOPES et al., 1998, BERTOLLO et al., 2000), não sendo comum encontrar formas híbridas entre os cariomorfos, como é o caso deste estudo, reforçando ainda mais a ideia de que estes cariomorfos são espécies distintas, visto que não há reprodução entre elas.

Atualmente, o cariomorfo A é amplamente distribuído ao longo de todas principais Bacias Hidrográficas na América do Sul, inclusive na região da Bacia do Rio Iguaçu (Tabela 1), sendo considerado natural para esta região (VICARI et al., 2006; BERTOLLO et al., 2000). O cariomorfo B é encontrado em um sistema lacustre no Rio Doce (MG) (BERTOLLO et al., 1979, BORN; BERTOLLO, 2000), no primeiro Planalto do Rio Iguaçu, região de São José dos Pinhais (PR) (LEMONS et al., 2002) e em um reservatório pertencente ao rio Paranapanema, porção do Alto Rio Paraná (ROSA et a., 2009) sendo esta a primeira descrição do presente citótipo para a Bacia do Baixo Rio Iguaçu. O cariomorfo D é endêmico da região do Alto Rio Paraná, como mostra a Tabela 2, sendo assim, no presente trabalho apresenta-se uma nova região de abrangência deste cariomorfo.

Sendo assim, a literatura traz dados semelhantes para as técnicas de citogenética clássica usados neste trabalho, referente aos três cariomorfos encontrados (Tabelas 1 e 2), e a partir disso sugere-se que a presença dos

citótipos D e B nesta região possa indicar uma possível implantação de espécies exóticas na área de estudo, indicando assim uma nova região de abrangência. Enquanto a similaridade com as demais populações do cariomorfo A, natural da bacia do Rio Iguaçu (VICARI et al., 2006), evidenciam ainda mais uma alta proximidade evolutiva.

A porção do Alto Rio Paraná compreende os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná e o limite entre esta porção e o Médio Rio Paraná é o salto das Sete Quedas, que surgiu durante o período quaternário, durante o Pleistoceno inferior e médio, período em que houve também o isolamento geográfico das traíras. A porção paranaense se estende até o município de Guaíra, em uma região atualmente submersa pelo reservatório da Usina Hidrelétrica Itaipu (DA ROSA et al., 2014, GALVES, SHIBATTA; JEREP, 2009, MANTESSO-NETO et al., 2004). Dessa forma, a bacia do Alto Rio Paraná não possui uma ligação direta com a bacia do Baixo Rio Iguaçu, havendo isolamentos geográficos entre essas duas bacias através de grandes barreiras, como as Sete Quedas e as cataratas do Iguaçu (BAUMGARTNER, 2012, MANTESSO-NETO, 2004). Dessa forma, sugere-se que as traíras pertencentes ao cariomorfo D nesta região, por apresentarem as mesmas características citogenéticas da população do Alto Rio Paraná, provavelmente foram trazidas por humanos, para estações de pescas e açudes e migrando para os rios durante épocas de enchentes e ou soltas diretamente nos rios. O mesmo cenário pode estar acontecendo para o cariomorfo B, o qual possui como região de ocorrência, um sistema lacustre do Vale do Rio Doce (MG) (BERTOLLO et al., 2000), com isolamentos geográficos entre as porções do Baixo Rio Iguaçu e do Alto Rio Iguaçu, que, não permitem a migração das traíras nas condições de relevo atual (BAUMGARTNER, 2012 LEMOS et al., 2002).

Trabalho realizado por Blanco et al. (2009) evidencia-se um processo de povoamento do cariomorfo F de *H. malabaricus*, natural no Rio São Francisco para regiões adjacentes através da transposição deste rio. Além disso, a migração do cariomorfo A para o Rio São Francisco também é descrita para essa região, mostrando que as influências antrópicas têm colaborado para o processo de implantação de espécies exóticas, inclusive dos cariomorfos de *H. malabaricus*. Neste mesmo trabalho, os autores evidenciam que o cariomorfo A é mais agressivo do que o cariomorfo F, podendo influenciar na dispersão destes cariomorfos (BLANCO et al., 2009) e o comportamento agressivo pode auxiliar na competição por alimento e habitat, tornando um destes cariomorfos mais susceptível a sobreviver na disputa por recursos. Porém, segundo os autores, estudos citogenéticos e comportamentais complementares são necessários para comprovar isso (BLANCO et al., 2010).

Ainda, segundo Baumgartner (2012) em pesquisa sobre a bacia do baixo Rio Iguaçu, destaca que há um aumento da introdução de espécies exóticas ao longo da bacia do rio Iguaçu e discute sobre as alterações causadas pela introdução destas espécies, com foco principal na extinção de espécies nativas. Para a bacia do Rio Iguaçu isto é muito sério, visto que casos de extinção se tornam em nível global, já que cerca de 70% das espécies encontradas nesta bacia não ocorrem em nenhum outro lugar do mundo (BAUMGARTNER, 2012).

Diante dos fatos mencionados, sugere-se que os cariomorfos encontrados no Rio Capanema, em Realeza, Paraná, pertencentes ao cariomorfos B e D, estejam ocorrendo nesta região por meio de introdução através de ações antropogênicas as quais alteram a fauna local, competição por alimento e habitat entre os cariomorfos distintos. É de grande importância que medidas sejam tomadas para a conservação da ictiofauna da

bacia do Rio Iguaçu, devido à diversidade e endemismo presentes neste local, além de estudos comportamentais para melhor entender como a presença de diferentes cariomorfos influenciará na competição por recursos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Cascavel e a Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza ambas pela estrutura cedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

BAUMGARTNER, G.; PAAVANELLI, C., S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A., G.; DEBONA, T.; FRANA, V., A. 2012. Peixes do Baixo Rio Iguaçu. Maringá.

BERTOLLO, L. A. C. 1978. Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (PISCES, ERYTHRINIDAE). Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, USP.

BERTOLLO, L., A., C.; TAKAHASHI, C., S.; MOREIRA-FILHO, O (1979) Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet*, v.2, p. 17-37.

BERTOLLO, L., A., C.; TAKAHASHI, C., S.; MOREIRA-FILHO, O. 1983. Multiple Sex Chromosomes in the Genus *Hoplias* (Pisces: Erythrinidae). *Cytologia*, v. 48, p. 1 – 12.

BERTOLLO, L., A., C.; FONTES, M., S.; FENOCCHIO, A., S.; CANO, J. 1997. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res*, v. 5, p. 493-499.

BERTOLLO, L., A., C.; MESTRINER, C., A. 1998. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromossome Research*, v. 6, p. 141-147.

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

BLANCO, D., R.; LUI, R., L.; BERTOLLO, L., A., C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. 2009. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *FishBiology And Fisheries*, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1-8, 13.

BORN, G., G.; BERTOLLO, L., A., C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res* v.8, p 111-118.

CIOFFI, M., B.; BERTOLLO, L., A., C. 2010. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, v. 105, p. 554-561.

CIOFFI, M., B.; MOLINA, W., F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L., A., C. 2011a. Chromosomal Distribution of Repetitive DNA Sequences Highlights the Independent Differentiation of Multiple Sex Chromosomes in Two Closely Related Fish Species. *Cytogenetic and Genome Research*. V. 104, p. 295-302.

CIOFFI, M., B.; SÁNCHEZ, A.; MARCHAL, J. A.; KOSYAKOVA, N.; LIEHR, T.; TRIFONOV., V.; BERTOLLO, L., A., C. 2011b. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. *Evolutionary biology*, v. 11.

DELARIVA, R. L.; NEVES, M., P.; LARENTIS, C.; KLIEMANN, B., C., K.; BALDAÇO, M., C.; WOLFF, L., L. 2018. Fish fauna in forested and rural streams from an ecoregion of high endemism, lower Iguazu River basin, Brazil. *Biota Neotrop.*, Campinas, v. 18, n. 3.

DERGAM, J., A.; BERTOLLO, L., A., C. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins. *Rev. Bras. Genet.* V. 13, n. 4, p. 755-766.

DERGAM, J.; A. 1996. Phylogeography and character congruence within the *Hoplias Malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex. Tese de doutorado. Colorado State University.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia*, v. 56, n. 3, 303-313.

FEREIRA, I., A.; BERTOLLO, L., A., C.; MARTINS, C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S Hin dIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on *the Hoplias Malabaricus* 'species complex'. *Cytogenetic and Genomic Research*. V.118, p. 78-83.

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

- FROTA, A.; GONSALVES, E., V., R. DEPRÁ., G., C.; GRAÇA, W., J. 2016. Inventory of the ichthyofauna from the Jordão and Areia river basins (Iguaçu drainage, Brazil) reveals greater sharing of species than thought. Check List, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 1995, nov.
- GALVES, W; SIBATTA, O. A., JEREP, F., P. 2009. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica, Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 30, n. 2, p. 141-154.
- GEMI, G; LUI, R., L.; TRECO, F., R.; PAIZ, L. M.; MORESCO, R., M, MARGARIDO, V.; P. 2014. Basic cytogenetics and physical mapping of 5S and 18S ribosomal genes in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Characiformes, Erythrinidae) from isolated natural lagoons: a conserved karyomorph along the Iguaçu river basin. CompCytogen, v. 8, 211- 222, 2014
- GRIFFITHS, S. P. 2000. The use of cloveoil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rock pool fishes, Journal of FishBiology, v. 57, p. 1453-1464.
- HAAF, T.; SCHMIDT, M.; STEINLEIN, C.; GALETTI-JR, P., M.; WILLARD, H., F. 1993. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Chrom. Research, v. 1.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- JULIO JR, H., F., C., C.; BONECKER, A., A., AGOSTINHO. 1997. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu; pp. 1–17, in: A.A. Agostinho and L.C. Gomes (eds.). Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. Maringá: EDUEM
- KANTEK, D. L. Z.; CIPRIANO, R. R.; ABILHOA, V.; ARTONI, R., F; CESTARI, M. M. 2016. Cytotaxonomic and evolutionary considerations about karyotypic data of fishes from the Iguaçu River Basin in South of Brazil. Brazilian Archives of Biology And Technology, [s.l.], v. 50, n. 5, p.793-802.
- LARENTIS, C.; DELARIVA, R., L.; GOMES, L., C.; BAUMGARTNER, D.; RAMOS, I., P.; SEREIA, D., A., O. 2016. Ichthyofauna of streams from the lower Iguaçu River basin, Paraná State, Brazil. Biota Neotrop., Campinas , v. 16, n. 3.
- LEMONS, P., M., M.; FENOCCHIO, A., S.; BERTOLO, L., A., C.; CESTARI, M., M. 2002. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçu river basin (Paraná State, Brazil). Caryologia, v. 55, n. 3, p. 193-198.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A., A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v. 52, p. 201-220.

LUI, R., L.; BLANCO, D., R.; MOREIRA-FILHO, O. MARGARIDO, V., P. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic&Histochemistry*, v. 87, p. 433–438.

MAACK, R. 1981. *Geografia física do Estado do Paraná*. 2.ed. Rio de Janeiro.

MANTESSO-NETO, V.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C., D., R.; BRYTO-NEVES, B., B. 2004. *Geologia do continente sul Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. Ceará.

MDK/CENCO. 1987. *Usina Hidrelétrica de Segredo: Rio Iguazu, Paraná, Brasil. Relatório de Impacto Ambiental*. Curitiba.

OLIVEIRA, E., A.; SEMBER, A.; BERTOLLO, L., A., C.; YANO., C., F.; EZAZ, T.; MOREIRA-FILHO, O.; HATANAKA, T.; TRIFONOV, V.; LIEHR, T.; AL-RIKABI, A., B., H.; RÁB, P.; PAINS, H.; CIOFFI., M.; B. 2017. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromossoma*.

OYAKAWA, O., T.; MATTOX, G., M., T. 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotrop. ichthyol.*, Porto Alegre , v. 7, n. 2, p. 117-140.

OYAKAWA, O., T. 1990. Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae). Unpublished Master Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 114p.

PARANÁ. GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. 2004 . **Livro Vermelho Da Fauna Ameaçada No Estado Do Paraná**. Curitiba: Governo do Estado do Paraná.

PAZZA, R.; JÚLIO-JR., H., F. 2003. Occurrence of Three Sympatric Cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the Upper Paraná River Foodplain (Brazil). *Cytologia*, v. 68, n. 2, p. 159-163.

ROSA, R da.; VANZELLA, A., L., L.; RUBERT, M.; MARTINS-SANTOS, I., C.; GIULIANO-CAETANO, L. 2009a. Differentiation of Y Chromosome in the X 1 X 1 X 2 X 2 / X 1 X 2 Y Sex Chromosome System of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Cytogenetic and Genome Research*, p. 54 – 60.

ROSA, R., CAETANO-FILHO, M.; SHIBATTA, A., O.; GIULIANO-CAETANO, L. 2009b. Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias aff. malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin. *Journal of Fish biology*, n. 75, p. 2682-2694.

ROSA, R., da.; VICARI, M., R.; DIAS, A., L.; GIULIANO-CAETANO, L. 2014. New Insights into the Biogeographic and Karyotypic Evolution of *Hoplias Malabaricus*. v.0, n.0.

SILVA, M. S; LERMEN, V. K.; NELLY, J. T. 2001. Variabilidade interanual da precipitação na bacia do rio Iguaçu. *Acta Scientiarum Maringá*, v. 23, n. 6, p. 1439-1444.

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

UTSONOMIA, R.; ALVES, J., C., P.; PAIVA, L., R., S.; COSTA-SILVA, G., J.; OLIVEIRA, C.; BERTOLLO, L., A., C.; FORESTI, F. 2014. Genetic differentiation among distinct karyomorphs

of the wolf fish *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes, Erythrinidae) and report of unusual hybridization with natural triploidy. *Journal of fish biology*, v. 1.

VICARI M., R.; ARTONI R., F.; BERTOLLO L., A., C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetic and Genome Research* v. 101, p. 24–28.

VICARI, M., R.; ARTONI, R., F.; BERTOLLO, L., A., C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*. V. 28, p. 103–110.

VICARI, M. R, PAZZA, R; ARTONI, R. F; MARGARIDO, V. P; BERTOLLO, L. A. C. 2006. Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu river. *Braz. arch. biol.technol.* v.49, n.2.