



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

**Evolução Cromossômica em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae).
Citogenética Comparativa entre
Cariomorfos.**

Nícolas Fernandes Martins

SÃO CARLOS-SP

2013

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

**Evolução Cromossômica em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes,
Erythrinidae). Citogenética Comparativa entre Cariomorfos.**

Nícolas Fernandes Martins

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi.

São Carlos

2013

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

M386ec

Martins, Nicolas Fernandes.

Evolução cromossômica em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). Citogenética comparativa entre cariomorfos / Nicolas Fernandes Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Citogenética. 2. Cariomorfos. 3. Evolução cariotípica. 4. DNA repetitivo. 5. Marcadores genéticos. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

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

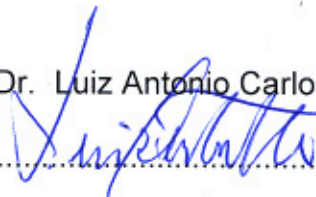
“Evolução Cromossômica em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes,
Erythrinidae). Citogenética Comparativa entre Cariomorfos”

Dissertação de Mestrado de

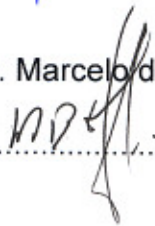
NÍCOLAS FERNANDES MARTINS

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo



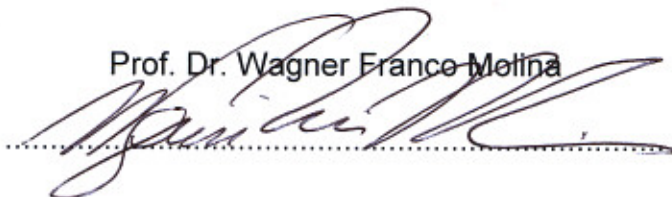
Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi



Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



Prof. Dr. Wagner Franco Molina



DEDICATÓRIA

O grande mentor desse trabalho é sem dúvida o prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo. Com sua simplicidade e amor me acolheu e me deu essa oportunidade.



A ele dedico este trabalho.

Nosso planeta tão é privilegiado, com tantas tecnologias, fachadas cheias de luzes. Tudo muito bonito o que homem fez e está fazendo! Entretanto, quando olhamos a abundância das plantações, temos que parar e pensar quanta comida nós produzimos e porque temos ainda tanta fome nesse Brasil. Infelizmente é histórica nossa riqueza escravocrata, desde o Brasil Colonial. Infelizmente, ainda nos deparamos com muita exploração de classes menos favorecidas, num modelo injusto e massacrante. Entretanto, mesmo diante desta desigualdade, acredito no estado da democracia, onde pessoas de alto nível espiritual poderão melhorar as condições injustas, num modelo justo para bem de todos. Parabéns aos professores da educação básica que são os desbravadores intelectuais das classes menos favorecidas que, de uma forma ou de outra, mostram os caminhos da verdade.

Nicolas Fernandes Martins, 05 de janeiro de 2013.

Israel Moreira Fernandes, que esteja no caminho da paz. e no caminho do amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que diretamente e indiretamente contribuíram com a construção desse trabalho. Em especial ao Dr. Marcelo de Bello Cioffi que, com paciência, me ajudou em vários momentos: ajustes das imagens, sugestões metodológicas e a ajuda no manuscrito. Agradeço ao órgão de fomento - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - que me concedeu recursos, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e à Universidade Federal de São Carlos (UFScar).

Agradeço à minha mãe - Gleice Gelma Martins Abreu - e ao meu grande pai - Clóvis de Souza - aos meus familiares que sem dúvida fazem parte dessa história.

Agradeço a todos do laboratório, em especial ao Dr. Orlando Moreira-Filho e ao Dr. Roberto Laridondo Lui que, com grande paciência, me ensinaram muitos conceitos de citogenética de peixes. Agradeço igualmente à Dra. Débora Coimbra (UFU-FACIP) que foi incentivadora para realização desse trabalho.

Aos demais amigos e colegas de trabalho: Eli, Gallo, Piau, Juliana, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração. Agradeço em especial a vários amigos que estiveram mais de perto, ao meu lado, auxiliando na obtenção e suporte dos resultados, ao Vinícius Marquioni e Juliana Poltronieri pelos momentos importantes na obtenção das hibridizações, sob a tuteta do co-orientador.

DADOS CURRICULARES

Nícolas Fernandes Martins

Nascido em 05 de abril de 1988, na cidade de Belo Horizonte-MG, Brasil, sendo criado no interior de São Paulo na cidade de Santa Cruz das Palmeiras-SP. cursou a educação básica na Escola Estadual Dr. Carlos Guimarães e, posteriormente, o Ensino Médio na Escola Comunitária. Iniciou o curso de Graduação na Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado da cidade de Ituiutaba-Mg, na Faculdade de Ciências Integradas do Pontal (UFU-FACIP), projeto pioneiro do Reuni, onde se graduou em Ciências Biológicas na modalidade licenciatura e bacharelado. Realizou projeto de extensão na Universidade, juntamente com a escola de educação básica Prof. Clóvis Salgado, trabalhando com crianças da zona rural, sendo uma das primeiras escolas do governo do estado de Minas Gerais em período integral. Participou na consolidação deste projeto e depois, como estagiário no laboratório didático da universidade no uso das ferramentas dos pacotes Br-Office do sistema operacional Linux. Ingressou no mestrado em 2011 sob-orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo e co-orientação do Dr. Marcelo de Bello Cioffi, trabalhando com citogenética de peixes *do* gênero *Erythinus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras/Tabelas	ii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	01
1.1. A família Erythrinidae	01
1.2. Variabilidade cariotípica nos Erythrinidae	02
1.2.1 <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	02
1.2.2 <i>Hoplias lacerdae</i> e outras espécies de trairões	02
1.2.3 Grupo <i>Hoplias malabaricus</i>	03
1.2.4 <i>Erythrinus erythrinus</i>	06
1.2.5 A diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos em <i>Erythrinus erythrinus</i>	08
2. Justificativa e Objetivos	11
3. Material e Métodos	13
3.1. Material	13
3.2. Métodos	14
3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos	14
3.2.2 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	15
3.3. Análise dos resultados	17
4. Resultados	18
Capítulo 1. Diferenciação e relações evolutivas em <i>Erythrinus erythrinus</i> (Characiformes, Erythrinidae). Ocorrência e distribuição de microcromossomos B	19
Capítulo 2. Diferenciação e relações evolutivas em <i>Erythrinus erythrinus</i> (Characiformes, Erythrinidae). Mapeamento cromossômico comparativo de sequências repetitivas	36
5. Considerações Finais	59
6. Referências Bibliográficas	64

LISTA DE FIGURAS/TABELAS

Material e Métodos

Fig. 1. Exemplar de *Erythrinus erythrinus* da região de Poconé (MT). Pag. 13.

Capítulo 1

Fig. 1. Locais de coleta das amostras de *Erythrinus erythrinus* analisadas no presente estudo. 1=Poconé (MT); 2=Barão de Melgaço (MT). Pag. 32.

Fig. 2. Cariótipo de *Erythrinus erythrinus* representativo de machos e fêmeas das populações de Poconé e Barão de Melgaço (MT), com $2n=54$ cromossomos, evidenciando três pares metacêntricos (m), um par subtlocêntrico (st) e vinte e três pares acrocêntricos (a), além de dois pequenos microcromossomos B (mi). Pag. 33.

Fig. 3. Cromossomos metafásicos representativos das populações de *Erythrinus erythrinus* das populações de Poconé e Barão de Melgaço (MT), evidenciando em (A) a ausência de cromossomos B, em (B) um microcromossomo B, em (C) dois microcromossomos B e em (D) três microcromossomos B (setas). Pag. 34.

Fig. 4. Frequência de microcromossomos B encontrados nas populações de *Erythrinus erythrinus* de Poconé e Barão de Melgaço (MT). Observe a frequência maior de 1-2 Bs/célula, seguida pela frequência intermediária de 3-4 Bs e pela frequência menor de 5-6 Bs/célula. Pag. 35.

Fig. 5. Diferenciações evolutivas propostas para as populações de *Erythrinus erythrinus* dos cariomorfos A ($2n=54$ cromossomos, sem cromossomos sexuais diferenciados) e B ($2n=54$ cromossomos nas fêmeas, $X_1X_1X_2X_2$ e $2n=53$ cromossomos nos machos, X_1X_2Y), com base nas características cariotípicas. Observe a ocorrência de microcromossomos B compartilhada por algumas populações dos cariomorfos A e B. Pag. 36

Capítulo 2

Fig. 1. Locais de coleta das amostras de *Erythrinus erythrinus* do Brasil (1. Barão de Melgaço, MT; 2. Birigui, SP; 3. Manaus, AM e Argentina (4. Resistência). Pag. 55.

Fig. 2. Cariótipos de machos e fêmeas dos cariomorfos A e C sob diferentes metodologias de análises. Os cromossomos foram submetidos à hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 5S, DNAr 18S e de elementos retrotransponíveis *Rex3* e contra-corados com DAPI. A co-localização dos sítios 5S e *Rex3* está indicada por setas nas figuras metafásicas. Observar o espalhamento significativo dos sítios conjugados DNAr 5S/*Rex3* no cariomorfo C. m=cromossomos metacêntricos; sm=cromossomos submetacêntricos; st=cromossomos subtelocêntricos, a=cromossomos acrocêntricos. Barra=5 µm. Pag. 56.

Fig. 3. Cromossomos metafásicos de machos e fêmeas dos cariomorfos A e C hibridizados com sondas dos microssatélites (CA)15 e (GA)15, mostrando o padrão de distribuição geral dessas repetições nos cromossomos. O grande cromossomo Y do cariomorfo C está indicado. Barra = 5 µm. Pag. 57.

Fig. 4. Visão geral da evolução cariotípica proposta para os cariomorfos A-D de *Erythrinus erythrinus* com base nas suas características cromossômicas gerais e no mapeamento de elementos repetitivos por FISH nos cariomorfos A, C e D. As principais mudanças a partir do provável cariótipo basal encontrado no cariomorfo A ($2n=54; 6m + 2st + 46a$) estão sublinhadas (modificado de Cioffi et al., 2010). Pag. 58.

Tabela 1. Regiões de coleta de *Erythrinus erythrinus* com os respectivos cariomorfos e fórmulas cromossômicas. Pag. 59.

Considerações Finais

Fig. 1. Diferenciação e relações evolutivas propostas para os cariomorfos A-D de *Erythrinus erythrinus* com base nas suas características cromossômicas gerais e no mapeamento de elementos repetitivos por FISH. As principais mudanças a partir do provável cariótipo basal encontrado no cariomorfo A ($2n=54; 6m + 2st + 46a$) estão sublinhadas (modificado de Cioffi et al., 2010). Pag. 64.

RESUMO

A família Erythrinidae, amplamente distribuída na região Neotropical, compreende apenas três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, todos endêmicos às Américas do Sul e Central. Esta família de peixes se caracteriza por uma evolução cariotípica divergente, oferecendo uma oportunidade excelente para a análise dos eventos evolutivos, quer seja no tocante à diferenciação do cariótipo como um todo, quer seja no tocante à diferenciação e evolução de sistemas de cromossomos sexuais. Neste contexto, destaca-se a espécie *Erythrinus erythrinus*, onde ocorre quatro cariomorfos distintos (A-D), portadores ou não de cromossomos sexuais heteromórficos. O objetivo principal deste projeto foi analisar a diferenciação cromossômica entre cariomorfos de *E. erythrinus* e suas relações evolutivas, empregando análises cromossômicas clássicas e mapeamento citogenético de diferentes seqüências de DNAs repetitivos por FISH. Os dados obtidos possibilitaram caracterizar a ocorrência de pequenos cromossomos supranumerários em alguns cariomorfos desta espécie, assim como diferenciações e similaridades entre cariomorfos ao nível dos marcadores moleculares. O mapeamento de diversas seqüências de DNAs repetitivos destacou características únicas ou compartilhadas entre cariomorfos, indicando os prováveis caminhos evolutivos durante a sua diferenciação. As características similares compartilhadas pelas populações do cariomorfo A reforçam a proposta de que elas constituem uma unidade evolutiva, apesar dos isolamentos existentes entre diferentes bacias hidrográficas onde elas ocorrem. Por outro lado, embora os cariomorfos C e D também compartilhem diversas características cariotípicas, alguns marcadores exclusivos mostram os caminhos evolutivos distintos entre eles. Embora não ocorram características morfológicas conspícuas facilmente detectáveis entre os diferentes cariomorfos, o conjunto das suas características cromossômicas corrobora fortemente que *E. erythrinus* corresponda a um complexo de espécies.

ABSTRACT

Erythrinidae is a relatively small Characiformes' fish family, but widely distributed in the Neotropics. This family comprises only three genera: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* and *Erythrinus*, all endemic to Central and South Americas. It is characterized by a divergent karyotype evolution and offers excellent opportunities for analyzing evolutionary events concerning the differentiation of the karyotype as a whole, as well as of the sex chromosome systems. In this sense, the species *Erythrinus erythrinus* presents four karyomorphs (A-D), in which homomorphic or heteromorphic sex chromosomes can be found. The main purpose of this study was to analyze the chromosomal differentiation among karyomorphs of *E. erythrinus* and their evolutionary relationships, using both conventional cytogenetic methods and the chromosomal mapping of repetitive DNAs sequences by FISH. The data showed the occurrence of small supernumerary chromosomes which are mitotically unstable, as well as useful molecular markers. Indeed, the mapping of several repetitive DNA sequences highlighted unique or shared features among the karyomorphs, indicating their evolutionary differentiation. The data also reinforce that distinct populations from karyomorph A behave as an evolutionary unit despite their wide geographic distribution. In turn, although the karyomorphs C and D share several karyotypic characters, they present specific molecular markers indicating their distinct evolutionary paths. Even though that morphological differentiations are not easily detectable among the karyomorphs, the set of the chromosomal features strongly corroborate that *E. erythrinus* belongs to a species complex.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A família Erythrinidae

A família Erythrinidae, amplamente distribuída na região Neotropical, é relativamente pequena entre os peixes Characiformes, compreendendo apenas três gêneros: *Hoplias* Gill, 1903; *Hoplerythrinus* Gill, 1895 e *Erythrinus* Scopoli, 1777. Esta família tem sido considerada como membro de um clado composto pelas famílias Lebiasinidae, Hepsetidae e Ctenolucidae (Vari et al., 1995), relação esta que já havia sido anteriormente também sugerido por Fink & Fink (1981).

Os eritrínídeos são popularmente conhecidos como traíras ou trairões (*Hoplias*) e jejús (*Hoplerythrinus* e *Erythrinus*). *Hoplias malabaricus* é o grupo que apresenta distribuição geográfica mais ampla, aparentemente presente na maioria das bacias hidrográficas sul-americanas (Oyakawa, 2003). Apesar de ser uma família relativamente pequena em comparação com outros grupos de peixes Neotropicais, a identificação precisa das espécies de Erythrinidae ainda é bastante problemática. Oyakawa (2003) relata apenas duas espécies para o gênero *Erythrinus* (*E. erythrinus*, com uma distribuição ampla na América do Sul e *E. kessleri*, com uma distribuição restrita no Brasil, provavelmente apenas ao Estado da Bahia) e três para o gênero *Hoplerythrinus* (*H. unitaeniatus*, *H. cinereus* e *H. gronovii*) e cerca de nove espécies para o gênero *Hoplias*. Na realidade, *H. malabaricus* e *H. lacerdae* devem corresponder a um grupo de espécies. Em revisão baseada em dados merísticos e morfométricos, foram

identificadas cinco espécies distintas para o grupo *H. lacerdae*, ou seja, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. curupira*, estas duas últimas correspondendo a espécies novas (Oyakawa & Mattox, 2009). No que se refere ao grupo *H. malabaricus*, os problemas taxonômicos ainda permanecem em aberto.

1.2– Variabilidade cariotípica nos Erythrinidae

1.2.1 –*Hoplerythrinus unitaeniatus*

Os estudos iniciais no gênero *Hoplerythrinus* já evidenciaram diferenciações cariotípicas em *H. unitaeniatus* de distintas bacias hidrográficas do Brasil, sendo verificada a presença de quatro formas cariotípicas distintas, provavelmente associadas a fusões e inversões cromossômicas, na população do rio Negro, região de Manaus, AM (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988). A compilação dos dados até agora disponíveis evidencia números diplóides variando de $2n=48$ a $2n=52$ cromossomos nessa espécie, associados a números também variáveis de cromossomos acrocêntricos, indicando um possível complexo de espécies (Giuliano-Caetano et al., 2001; Diniz & Bertollo, 2003; Rosa et al., 2012). Em nenhuma das populações de *H. unitaeniatus* até agora estudadas foi evidenciada a presença de cromossomos sexuais heteromórficos.

1.2.2 –*Hoplias lacerdae* e outras espécies de trairões

Diferentemente da maioria das espécies de eritrínídeos, *H. lacerdae* e outras espécies de grande porte (trairões) tem se caracterizado por apresentar cariótipos

conservados em relação ao número cromossômico e fórmula cariotípica, mantendo $2n=50$ cromossomos meta- e submetacêntricos, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (Bertollo et al., 1978; Morelli et al., 2007; Blanco et al., 2011). De fato, tais características parecem ser peculiares às espécies de trairões, visto que todas as demais espécies de Erythrinidae se caracterizam por apresentar uma diversidade cariotípica, tanto numérica como estrutural (Bertollo, 2007). No entanto, diferenciações no tocante a distribuição de DNAs repetitivos puderam ser constatadas entre os cariótipos de espécies do grupo dos trairões, *H. aimara* e *H. intermedius* (Blanco et al., 2011), sinalizando que este grupo deve se enquadrar entre os casos já conhecidos onde a especiação não se encontra associada à mudanças acentuadas na macroestrutura do cariótipo, mas sim a diferenciações mais discretas na organização interna dos cromossomos.

1.2.3 – Grupo *Hoplias malabaricus*

Embora usualmente referida como uma única entidade taxonômica, *H. malabaricus* possui uma grande diversidade cariotípica, apresentando diferenças populacionais significativas (Bertollo et al., 1978, 1983; Dergam & Bertollo, 1990; Bertollo et al., 1997a, 1997b, 2000; Born & Bertollo, 2000; Vicari et al., 2005; Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2009a, b; Cioffi et al., 2012a). Os dados cromossômicos corroboram a ocorrência de um grupo de espécies em *H. malabaricus*, onde sete formas cariotípicas distintas (A-G) já foram diferenciadas (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2012a). Estas

formas, denominadas cariomorfos, representam diferenciações gerais no caritipo quanto ao número diplóide, morfologia dos cromossomos ou sistemas de cromossomos sexuais, já fixadas nas populações, não correspondendo assim a polimorfismos cromossômicos específicos, usualmente associados a um dado par de cromossomos.

O cariomorfo A é caracterizado pela presença de $2n = 42$ cromossomos meta- e submetacêntricos em ambos os sexos, sem um aparente sistema de cromossomos sexuais. O cariomorfo B, embora também apresentando $2n = 42$ cromossomos e uma estrutura cariotípica semelhante ao do cariomorfo A, diferencia-se deste último pela presença de cromossomos sexuais heteromórficos, característicos de um sistema XX/XY (Born & Bertollo, 2000; Cioffi et al., 2010b). O cariomorfo C apresenta $2n = 40$ com cromossomos meta- e submetacêntricos, tanto nos machos como nas fêmeas, porém com um sistema de cromossomos sexuais XY em estágio inicial de diferenciação (Cioffi & Bertollo, 2010). O cariomorfo D é caracterizado por $2n = 40$ e $2n = 39$ cromossomos nas fêmeas e nos machos, respectivamente, devido a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Bertollo et al. 1997b, 2000; Cioffi & Bertollo, 2010). O cariomorfo E possui $2n=42$ cromossomos, assim como os cariomorfos A e B, diferenciando-se destes últimos pelo primeiro par de cromossomos que apresenta tamanho relativamente maior, assim como pela presença de um par de cromossomos acrocêntricos, o que representa uma característica rara no grupo *H. malabaricus*. O cariomorfo F possui $2n=40$ cromossomos nos machos e nas fêmeas, sem um sistema de cromossomos sexuais diferenciados. Diferencia-se do cariomorfo C,

o qual também possui $2n=40$ cromossomos, pela presença de um par metacêntrico grande, o maior em tamanho entre os representantes do grupo *H. malabaricus*, enquanto que o segundo par cromossômico corresponde, tanto no tamanho como na morfologia, ao primeiro par encontrado no cariomorfo E. O cariomorfo G possui uma estrutura cariotípica similar àquela apresentada pelo cariomorfo F, diferenciando-se pela presença de $2n=40$ cromossomos nas fêmeas e $2n=41$ cromossomos nos machos, devido a um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo XX/XY_1Y_2 (Bertollo et al., 2000; Bertollo, 2007).

Considerando a morfologia cariotípica geral, Bertollo et al. (2000) reconheceram dois grupos cromossômicos maiores em *H. malabaricus*, um deles constituído pelos cariomorfos A, B, C, D (Grupo 1) e o outro pelos cariomorfos E, F, G (Grupo 2). Assim, os cariomorfos A e B apresentam uma constituição cariotípica geral mais similar com os cariomorfos C e D, apesar das diferenças existentes quanto aos números diplóides e sistemas de cromossomos sexuais, evidenciando uma relação evolutiva aparentemente próxima entre si. Tal relação foi de fato corroborada pelo mapeamento citogenético de diferentes classes de DNAs repetitivos, onde a análise comparativa desses marcadores forneceu evidências resolutivas sobre a organização cromossômica desses cariomorfos. A distribuição de diferentes classes de DNAs repetitivos (incluindo DNA ribossomais, DNAs satélite, seqüências teloméricas, e várias repetições microssatélites), destacou a estreita relação entre estes quatro cariomorfos, dando apoio adicional à proposição de que eles constituem um grupo evolutivo relacionado no grupo

H. malabaricus. Adicionalmente, foi também demonstrada uma maior proximidade entre os cariomorfos A e B, assim como entre os cariomorfos C e D, com base nos marcadores específicos por eles compartilhados (Cioffi et al., 2009a). Entretanto, análises de pintura cromossômica, a partir de sondas obtidas por microdissecção do cromossomo X, mostraram que esse cromossomo tem origem independente nos cariomorfos B e C/D, embora estes cariomorfos apresentem uma estreita relação entre si (Cioffi et al., 2011a).

1.2.4 – *Erythrinus erythrinus*

O gênero *Erythrinus* também é caracterizado por uma variação cariotípica conspícua, considerando diferentes populações de *E. erythrinus* analisadas. Quatro cariomorfos A-D já puderam ser claramente identificados (Bertollo et al., 2004). O cariomorfo A caracteriza-se por $2n=54$ cromossomos, sendo $6m + 2st + 46a$, sem cromossomos sexuais heteromórficos, presente nas bacias do Alto e Baixo Paraná. Os cariomorfos B a D diferenciam-se do cariomorfo A pela presença de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. O cariomorfo B apresenta $2n=54$ cromossomos nas fêmeas ($6m + 2st + 46a$) e $2n=53$ cromossomos nos machos ($7m + 2st + 44a$), ocorrendo na bacia do Alto Paraná. Ambos os cariomorfos C e D apresentam $2n=52/51$ cromossomos nas fêmeas e machos, respectivamente, diferindo entre si quanto ao número de cromossomos metacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Assim, o cariomorfo C apresenta $6m + 2sm + 6st + 38a$ nas fêmeas e $7m$

+ 2sm + 6st + 36a nos machos, com ocorrência na bacia Amazônica, enquanto que o cariomorfo D apresenta 4m + 2sm + 2st + 44a nas fêmeas e 5m + 2sm + 2st + 42a nos machos, com ocorrência em bacias do Nordeste. A diversidade cromossômica encontrada em *E. erythrinus*, com rearranjos cromossômicos já fixados entre diferentes populações isoladas, além da ocorrência/ausência de cromossomos sexuais diferenciados entre as populações, é também indicativa de um grupo de espécies distintas provavelmente presente nesse grupo, à semelhança do que ocorre em *H. malabaricus* e *H. unitaeniatus*.

Duas populações alopátricas de *E. erythrinus*, correspondentes aos cariomorfos A e D, foram adicionalmente investigadas quanto à dispersão genômica de elementos transponíveis *Rex3* associados ao DNAr 5S e à diferenciação do sistema de cromossomos sexuais múltiplos. Foi constatado que estes retrotransposons tiveram um papel marcante na diferenciação cromossômica do cariomorfo D, mostrando-se dispersos na maioria dos cromossomos. De fato, enquanto que no cariomorfo A foi evidenciada uma distribuição restrita dos sítios *Rex3* na região centromérica de apenas um par de cromossomos acrocêntricos, no cariomorfo D foram evidenciados inúmeros sítios, igualmente localizados na região centromérica de cromossomos acrocêntricos, totalizando 22 sítios nas fêmeas e 21 sítios nos machos. Todos os sítios de DNAr 5S mostraram-se co-localizados com os de *Rex3*, sugerindo que estes elementos estão associados no genoma. Adicionalmente, a origem por fusão cêntrica do cromossomo Y metacêntrico no cariomorfo D foi evidenciada pela presença de um ITS (sítio telomérico

instersticial), assim como pela presença de sítios 5S DNAr/*Rex3* neste cromossomo. Assim sendo, além da fusão cêntrica associada com a diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos do cariomorfo D, foi destacado um aumento surpreendente de sítios associados de DNAr5S/*Rex3* em contraste com o cariomorfo A. Considerando a hipótese provável que o cariomorfo D representa uma forma derivada em relação ao cariomorfo A, os resultados obtidos demonstram claramente uma enorme dispersão dos elementos associados DNAr 5S/*Rex3* nas regiões centroméricas dos cromossomos acrocêntricos. Assim, é provável que seqüências do retroelemento *Rex3* tenham se inserido no DNAr 5S e que o complexo DNAr 5S/*Rex3* tenha se dispersado no cariótipo (Cioffi et al., 2010a). Aparentemente, a freqüente associação entre as regiões centroméricas dos cromossomos acrocêntricos parece propiciar condição favorável para a ocorrência de tal dispersão (Cioffi et al., 2010a).

1.3 - A Diferenciação dos cromossomos sexuais múltiplos em *Erythrinus erythrinus*

Os peixes oferecem excelentes condições para analisar a evolução dos cromossomos sexuais, fornecendo inclusive informações importantes para a compreensão deste processo nos vertebrados como um todo. Neste cenário, os peixes da família Erythrinidae apresentam-se como modelos propícios para estudar a evolução dos cromossomos sexuais. Estudos recentes têm contribuído para a elucidação dos processos de diferenciação cariotípica e dos cromossomos sexuais presentes no grupo *E.*

erythrinus, com base no mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA e nos experimentos de pintura cromossômica. De fato, o emprego de tais metodologias permitiu avançar no conhecimento da composição molecular dos cromossomos, bem como nos processos de sua diferenciação.

Estudos prévios de citogenética convencional já haviam evidenciado que os cariomorfos B, C e D de *E. erythrinus* apresentam um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, enquanto que distintas populações do cariomorfo A não evidenciam cromossomos sexuais heteromórficos (Bertollo et al., 2004). Adicionalmente, o mapeamento citogenético de distintas classes de DNAs repetitivos (DNAr 5S, Cot-1 DNA, *Rex3* e repetições teloméricas), em uma população do cariomorfo A e do cariomorfo D de *E. erythrinus* evidenciaram que o grande cromossomo Y (metacêntrico) deste último cariomorfo resultou de um evento de fusão cêntrica, ao mesmo tempo em que modificações genômicas acentuadas se mostraram significativas na diversificação desses cariomorfos (Cioffi et al., 2010a).

Estudos complementares com pintura cromossômica, utilizando sondas de cromossomos sexuais inteiros isolados por microdissecção, possibilitaram elucidar ainda mais esta questão. Sondas dos cromossomos Y (cariomorfo D de *E. erythrinus*) foram utilizadas em experimentos de “wcp” (whole chromosome painting), para investigar a evolução do sistema X_1X_2Y . Os resultados mostraram que este sistema foi derivado de proto-cromossomos XY, morfologicamente indiferenciados, presentes no cariomorfo A, para o qual ainda não foi identificado nenhum marcador específico.

Fusão cêntrica, envolvendo este proto-par XY e um par de autossomos, deram de fato origem ao grande metacêntrico neo-Y que caracteriza o sistema X_1X_2Y do cariomorfo D (Cioffi et al., 2011b).

Os resultados de pintura cromossômica, somados aos padrões distintos de distribuição dos DNAs repetitivos, realçam a plasticidade de diferenciação dos cromossomos sexuais na família Erythrinidae, destacando que os cromossomos sexuais em espécies de peixes podem seguir padrões distintos de diferenciação, mesmo entre espécies proximamente relacionadas ou entre sistemas idênticos de cromossomos sexuais (Cioffi et. al., 2011a, b).

2- JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO

Conforme já evidenciado, os peixes eritrínídeos se caracterizam por uma evolução cariotípica divergente, onde se destacam grupos de espécies com uma macroestrutura cariotípica conservada, ao lado de outros com uma diversidade acentuada quanto ao número e morfologia cromossômica. Distintos cariomorfos evidenciam um provável grupo de espécies, hoje englobadas em uma mesma entidade taxonômica. Em uma mesma espécie nominal como, por exemplo, *E. erythrinus* ocorrem espécimes portadores de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos, ao lado de outros com cariótipos homomórficos entre os sexos. Assim sendo, esse grupo oferece oportunidades excelentes para a análise dos eventos evolutivos, quer seja no tocante à diferenciação do cariótipo como um todo, assim como no tocante à diferenciação e evolução de sistemas de cromossomos sexuais, aspecto este que vem despertando um interesse crescente na biologia evolutiva nos últimos anos. Adicionalmente, os recentes avanços metodológicos da citogenética molecular vêm permitindo uma exploração mais ampla e resolutiva dos eventos associados à evolução do cariótipo, com o mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas de DNA e o emprego da pintura cromossômica.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar a estrutura do cariótipo de novas populações de *E. erythrinus* e a comparação dos dados obtidos com populações já analisadas, buscando ampliar os conhecimentos sobre a evolução cromossômica deste

grupo e a caracterização de sua biodiversidade. Para tanto, além das análises cromossômicas clássicas, foi também analisada a diferenciação genômica entre populações de *E. erythrinus*, portadoras e não portadoras de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos, no tocante à distribuição de diferentes seqüências repetitivas de DNA em nível cromossômico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Foram utilizados espécimes machos e fêmeas de *Erythrinus erythrinus* (Figura 1), provenientes da bacia do Paraguai (região de Barão de Melgaço, MT) e de Poconé, MT), da bacia do Alto Paraná (região de Birigui, SP) e do Baixo Paraná (Resistência, AR), todos representativos do cariomorfo A, assim como espécimes provenientes da bacia Amazônica (região de Manaus, AM), representativos do cariomorfo C. Os espécimes da região de Barão de Melgaço e Poconé foram aqui analisados pela primeira vez, enquanto que os espécimes das demais populações foram anteriormente analisados apenas por procedimentos de citogenética clássica.



Fig. 1. Exemplar de *Erythrinus erythrinus* da região de Poconé (MT). Comprimento total = 16,0 cm.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Obtenção de cromossomos mitóticos

Foi adotada a metodologia descrita por Bertollo et al. (1978) para preparações cromossômicas *in vivo*. Os espécimes foram injetados com solução aquosa de colchicina (0,025%), na região abdominal, na proporção de 1ml/100g de peso. Posteriormente, o exemplar foi mantido em aquário sob aeração durante 40-50 minutos, sendo posteriormente anestesiado e sacrificado, sendo retirada a região anterior do rim. Este material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M) e transferido para pequenas cubas de vidro, contendo cerca de 10 ml desta mesma solução, sendo bem fragmentado com o auxílio de pinças de dissecação. Este procedimento foi complementado com o emprego de uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, aspirando e eliminando várias vezes os fragmentos de tecidos, facilitando assim a separação das células e a obtenção de uma suspensão celular homogênea. A suspensão celular obtida foi incubada em estufa a 36-37°C, durante vinte minutos. O material foi então revolvido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo de centrífuga, adicionando-se algumas gotas (5-6) de fixador recém-preparado (metanol + ácido acético glacial 3:1). A mistura foi novamente revolvida várias vezes e centrifugada durante 10 minutos a 500-800 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se ao sedimento celular 5-7ml de fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo. O material foi revolvido novamente com auxílio da pipeta Pasteur, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e

eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de fixador ao sedimento celular, misturando-os bem. A suspensão celular foi então guardada em freezer, acondicionada em pequenos frascos.

3.2.2 - Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH)

A. Sondas

Foram utilizadas as seguintes sondas de seqüências de DNAs repetitivos para o mapeamento citogenético:

- a) DNAr 5S, incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS), isoladas diretamente do genoma de *H. malabaricus* (Martins et al., 2006).
- b) DNAr 18S, incluindo um segmento de 1.400 pares de bases do gene codificante do RNAr 18S, obtida por PCR a partir do DNA nuclear de *H. malabaricus* (Cioffi et al., 2009b).
- c) Elemento retrotransponível *Rex3*, obtida por PCR à partir do genoma de *E. erythrinus* (Cioffi et al., 2010a).
- d) Oligonucleotídeos enriquecidos com microsattelites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ (Kubat et al. 2008)

B. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas com biotina-16-dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) ou com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do manual do fabricante. Os produtos destas reações foram precipitados com acetato de Potássio e etanol durante 16h à -20° C. Posteriormente, os materiais foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm, descartando os sobrenadantes. Os DNAs marcados foram submetidos à secagem completa em estufa a 37° C.

C. Preparação das lâminas, hibridização e detecção do sinal

As preparações cromossômicas foram inicialmente incubadas com RNase (40 μ g/ml) por 1h à 37° C em câmara úmida. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/ 2xSSC, o material foi desidratado em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho . As misturas de hibridização, contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida em um volume final de 30 μ l , foram aquecidas a 100° C por 10 minutos e então aplicadas sobre as lâminas e a hibridização realizada por um período de 16-18h à 37° C em câmara úmida. No caso de experimentos de dupla-FISH, sondas biotiniladas e marcadas com digoxigenina foram adicionadas concomitantemente no mix de hibridização em uma proporção de 1:1. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em formamida 50% durante 15 minutos, seguida de uma segunda lavagem em 2xSSC de 15 min, e uma última lavagem em 4xSSC por 15 min à temperatura ambiente. A detecção das sondas

foi realizada com conjugado avidina-FITC 0,07%(Sigma) em tampão C (0.1 M NaHCO₃ , 0,15 M NaCl) por 1h para sondas previamente marcadas com biotina ou com anti-digoxigenina-rhodamina (Roche) em tampão C (0.1 M NaHCO₃ , 0,15 M NaCl), também por 1h, para sondas previamente marcadas com digoxigenina. Em experimentos de dupla-FISH as detecções foram realizadas concomitantemente. Os cromossomos foram contracorados com DAPI (1,2 µg/ml) e as lâminas foram montadas em solução Antifading (Vector Laboratories).

3.3. Análise dos resultados

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados, sendo as imagens capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic). Foram analisadas cerca de 30 metáfases de cada espécime.

Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), conforme a relação de braços (Levan et al., 1964). Foi mantida uma padronização quanto à apresentação do cariótipo dos diferentes cariomorfos, para possibilitar uma análise comparativa apropriada entre as mesmas.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão sendo apresentados na forma de dois capítulos, um deles a ser submetido para publicação (Capítulo 1) e o outro já publicado (Capítulo 2). Todas as referências bibliográficas encontram-se relacionadas no final desta dissertação.

Diferenciação e relações evolutivas em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): ocorrência e distribuição de micro-cromossomos B.

Nícolas Fernandes Martins • Marcelo de Bello Cioffi • Waldo Pinheiro Troy • Juliana de Fátima Martinez • Orlando Moreira-Filho • Luiz Antonio Carlos Bertollo

Resumo

Erythrinus erythrinus, espécie de peixe Neotropical pertencente à família Erythrinidae, apresenta uma ampla distribuição na América do Sul. Análises citogenéticas convencionais mostraram uma extensa diversidade cariotípica entre populações desta espécie, com quatro cariomorfos (A-D) até então conhecidos. Neste estudo foi investigada a estrutura cariotípica de duas novas populações de *E. erythrinus* provenientes da região do Pantanal de Mato-Grosso (Brasil), buscando subsídios adicionais no tocante à diferenciação cariotípica e biodiversidade desse grupo. Ambas as populações mostraram as mesmas características cromossômicas, apresentando $2n=54$ cromossomos (6 m + 2 st + 46 a) sem diferenciação entre machos e fêmeas, enquadrando-se assim entre as populações representativas do cariomorfo A. Adicionalmente, idênticos micro-cromossomos supranumerários foram encontrados nas duas populações. Tais cromossomos apresentam-se mitoticamente instáveis, com variações numéricas tanto intra como inter-individuais. Os dados obtidos indicam que, em adição aos demais rearranjos cromossômicos ocorridos, os cromossomos B também participaram da diferenciação cariotípica de *E. erythrinus*, provavelmente representando uma característica ancestral para o grupo.

Introdução

A família Erythrinidae, representada pelos gêneros *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, possui um número relativamente pequeno de espécies. Particularmente no tocante ao gênero *Erythrinus*, são reconhecidas duas espécies nominais, *E. erythrinus*, mais amplamente distribuída pela região Neotropical, e *E. kessleri*, de distribuição mais restrita (Oyakawa, 2003). Entretanto, do ponto de vista cariotípico, *E. erythrinus* parece corresponder a um complexo de espécies, com quatro cariomorfos (A-D) até então identificados, os quais diferem tanto no número como na morfologia dos cromossomos, bem como na ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos (revisado em Cioffi et al., 2012). Especialmente no tocante ao cariomorfo A, as populações já analisadas apresentam $2n=54$ cromossomos (6 metacêntricos + 2 subtelocêntricos + 46 acrocêntricos), tanto nos machos como nas fêmeas, sem evidências da presença de cromossomos sexuais heteromórficos. Já os outros três cariomorfos conhecidos deste grupo evidenciam um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, com fórmulas cariotípicas distintas. Assim, o cariomorfo B apresenta $2n=54$ cromossomos nas fêmeas e $2n=53$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 6m + 2st + 46a$; $\text{♂ } 7m + 2st + 44a$), enquanto que o cariomorfo C apresenta $2n=52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 6m + 2sm + 6st + 38a$; $\text{♂ } 7m + 2sm + 6st + 36a$) e o cariomorfo D possui $2n=52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 4m + 2sm + 2st + 44a$; $\text{♂ } 5m + 2sm + 2st + 42a$).

Adicionalmente, a ocorrência de pequenos cromossomos supranumerários, morfológicamente semelhantes a “double minutes”, já foi registrada para algumas populações de *E. erythrinus* (Bertollo et al., 2004). Desde a sua descoberta no século passado (Wilson, 1907, Camacho et al., 2000), os cromossomos supranumerários, ou cromossomos B, têm sido alvo de muitas investigações sobre a sua origem e o seu significado biológico. Mostram-se presentes em diversos grupos de organismos (Jones & Rees, 1982), mas são elementos dispensáveis, que usualmente não seguem um padrão de herança mendeliana, apresentando segregação irregular durante a meiose (Jones e Rees, 1982; Beukeboom, 1994, Camacho et al., 2000). Geralmente apresentam-se menores em tamanho e distintos na morfologia em relação aos cromossomos do complemento padrão ou cromossomos A, com evolução associada a processos de heterocromatinização e acúmulo de DNAs repetitivos e elementos transponíveis (Camacho et al., 2000).

No presente estudo foi investigada a estrutura cariotípica de *E. erythrinus*, provenientes de duas regiões distintas daquelas das demais populações já analisadas desta espécie. O principal objetivo foi a caracterização de novas populações no contexto da biodiversidade cromossômica existente dentro desta espécie nominal, buscando novos subsídios no tocante à sua evolução divergente. Os resultados apontaram para uma participação mais ampla dos cromossomos B na diversificação cariotípica de *E. erythrinus*. O conjunto dos dados já obtidos sugere que *E. erythrinus* corresponde à um complexo de espécies, com problemas taxonômicos a serem ainda resolvidos.

Material e Métodos

Espécimes

Foram analisados 40 espécimes de *Erythrinus erythrinus* provenientes de duas localidades distintas, totalizando 16 fêmeas e 14 machos da região de Barão de Melgaço-MT (16°10'16.67"S; 55°57'26.28"O) e 7 fêmeas e 3 machos da região de Poconé-MT (16°15' 48.32"S; 56°37'48.64"O) (Figura 1). Ambas as localidades encontram-se proximamente situadas no Pantanal de Mato-Grosso, o qual é constituído por uma área de 250 mil km² na região Centro-Oeste do Brasil, alagada em sua maior parte. Os espécimes desta região brasileira foram analisados pela primeira vez no presente estudo.

Preparação dos cromossomos mitóticos

Os animais foram previamente tratados com solução de colchicina a 0,005% (1ml de solução / 100 gramas de peso do animal), por um período de 40-50 minutos. A seguir, após procedimentos anestésicos, foram extraídos fragmentos do rim anterior, procedendo-se a hipotonização celular em KCl 0.075M durante 20 minutos a 36 °C, a fixação em álcool metílico (3 partes) : ácido acético glacial (1 parte) e a preparação das lâminas, conforme o procedimento usualmente utilizado para a metodologia de “air drying” (Bertollo et al., 1978). As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX50), sendo as imagens capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic). Foram analisadas pelo menos 30

metáfases de cada espécime para a comprovação do número diplóide. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), conforme a relação de braços (Levan et al., 1964).

Resultados

O cariótipo de ambas as amostras apresentaram as mesmas características, ou seja, $2n=54$ cromossomos, sendo $6 m + 2 st + 46 a$, sem diferenciação entre machos e fêmeas (Figura 2).

Adicionalmente, ambas também evidenciaram a ocorrência de microcromossomos acessórios ao complemento padrão, denominados cromossomos B. Considerando a amostra de 521 metáfases analisadas, foram encontrados de zero a seis cromossomos B por célula, onde a frequência maior é de células não portadoras de Bs (38,9%), seguidas por células portadoras de 1B (20,9%) e 2Bs (20,5%). As células portadoras de 3 a 6 Bs foram menos frequentes, cuja somatória corresponde a 19,7% das células examinadas. Assim sendo, as células com 1 ou 2 cromossomos B correspondem a 41,4% das células portadoras desses cromossomos, contrastando acentuadamente em frequência com as células portadoras de um número maior de Bs (Figuras 3 e 4).

Discussão

Os novos representantes de *E. erythrinus* aqui analisados apresentaram a mesma constituição cariotípica, evidenciando as características cromossômicas típicas do cariomorfo A de *E. erythrinus*, diferenciando-se portanto dos demais cariomorfos desta espécie (Bertollo et al., 2004). Os dados até agora obtidos evidenciam que o cariomorfo A possui uma distribuição geográfica mais ampla em relação aos demais cariomorfos. De fato, enquanto que o cariomorfo A já foi evidenciado nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e no norte da Argentina, os cariomorfos B-D tem apresentado uma localização mais pontual (Bertollo et al., 2004 e presente estudo).

A ocorrência de micro-cromossomos B, geralmente apresentando o aspecto de “double minutes”, foi também evidenciada. “Double-minutes” são pequenas estruturas comumente presentes em diferentes células tumorais humanas, correspondendo a ampliações gênicas que podem conter oncogenes e genes de resistência às drogas, replicando-se como os demais cromossomos durante a divisão celular (Barker, 1982). Os micro-cromossomos B mostraram-se presentes nos espécimes das duas regiões investigadas, sendo mais fracamente corados que os cromossomos do complemento padrão.. Entretanto, tais cromossomos não são um atributo exclusivo dos *E. erythrinus* ora investigados, visto que algumas outras populações dos cariomorfos A e B também compartilham esta ocorrência. Análises citogenéticas realizadas por Bertollo et al. (2004), evidenciaram que o cariomorfo A deve representar a condição ancestral em *E. erythrinus*, a partir do qual teriam se diversificado os demais cariomorfos conhecidos.

Dentre estes, o cariomorfo B é o que mostra maior proximidade com o cariomorfo A, mantendo o mesmo número de cromossomos nas fêmeas $2n=54$ e a sua redução para $2n=53$ nos machos pela diferenciação de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Bertollo et al., 2004). A ocorrência de um mesmo tipo de Bs em diferentes populações e cariomorfos de *E. erythrinus* de diferentes regiões geográficas provavelmente indica a ancestralidade da origem desses cromossomos. Assim sendo, é mais parcimonioso considerar que estes cromossomos também representariam uma característica basal para o grupo, sendo presentemente encontrado entre algumas populações dos diferentes cariomorfos, com ou sem cromossomos sexuais diferenciados (Figura 5). De fato, uma das características principais dos cromossomos B é a sua não-universalidade, ou seja, mostram-se presentes entre alguns indivíduos de algumas populações de uma dada espécie, seguindo um caminho evolutivo próprio (Camacho et al., 2000). Neste contexto, é de se esperar que outras populações dos diferentes cariomorfos, além daquelas até então analisadas, possam também mostrar a ocorrência desses cromossomos adicionais na sua estrutura, questionando as possíveis funções exercidas por estes cromossomos.

Em geral, a ausência de caracteres fenotípicos decorrentes da presença dos Bs favorece a proposta de que eles sejam elementos genômicos parasitas, sem efeitos benéficos aos seus portadores (Camacho et al., 2000). Entretanto, algumas situações específicas falam a favor de uma possível função exercida por esses cromossomos. Tal é o caso de uma espécie de ciclídeo do Lago Vitória onde um cromossomo B fêmea

específico é portador de vários genes codificantes de proteínas, destacando um possível efeito funcional na determinação do sexo feminino (Yoshida et al., 2011). Igualmente em *Chilomycterus spinosus* (Tetraodontiformes), um cromossomo B se mostra restrito aos machos e se comporta como univalente durante a meiose, também sugerindo a possível relação com a determinação do sexo nesta espécie (Noletto et al., 2012). Por sua vez, em *Astyanax scabripinnis* a ocorrência de cromossomos B se mostra mais freqüente em um dos sexos, neste caso também nas fêmeas, além de apresentar maior incidência em populações situadas em maiores altitudes comparativamente àquelas situadas em menores altitudes (Néo et al., 2000a, b), podendo sugerir algum possível efeito adaptativo.

A ocorrência de cromossomos B já é amplamente conhecida entre os peixes. Carvalho et al. (2008), destacam 61 espécies portadoras desses cromossomos distribuídas em diferentes famílias, com predominância nas ordens Characiformes e Siluriformes. Tais cromossomos podem apresentar diferentes morfologias e tamanhos, variando desde muito pequenos, como em *Prochilodus* (Pauls e Bertollo, 1983) e *Moenkhausia* (Foresti et al., 1989), até com tamanho idêntico ou mesmo maior que os maiores cromossomos do complemento padrão, como em *Rhamdia* (Fenocchio e Bertollo, 1990) e *Astyanax* (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992). Sua origem também tem sido objeto de diversas investigações. Em algumas espécies, como *Astyanax scabripinnis*, há boas evidências de que macro-cromossomos B correspondam a isocromossomos (Vicente et al., 1996; Mestriner et al., 2000; Vicari et al., 2011). Em

Prochilodus lineatus a origem intra-específica dos Bs também parece provável, com base em marcadores cromossômicos obtidos a partir de DNAs repetitivos (Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006).

A instabilidade mitótica é um atributo marcante da maioria dos cromossomos Bs, tanto nos peixes como nos demais organismos (Jones e Rees, 1982). Entretanto, há também vários casos já registrados evidenciando um comportamento mitótico mais estável para esses cromossomos, como em algumas populações de *Astyanax scabripinnis* onde um macrocromossomo B é permanentemente encontrado nas células de seus portadores (Moreira-Filho et al., 2004). Contudo, é interessante destacar que em algumas espécies, como no peixe *Prochilodus lineatus*, cromossomos B mitoticamente instáveis passaram a ter um comportamento estável ao longo do tempo. Populações naturais dessa espécie apresentam usualmente de zero a sete pequenos cromossomos B (Pauls e Bertollo, 1983; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Artoni et al., 2006), os quais podem entretanto chegar até o limite de nove em cruzamentos controlados (Voltolin et al., 2011). Em uma população natural desta espécie, analisada mais detalhadamente, verificou-se que a frequência dos Bs dobrou durante certo período de tempo, passando então a permanecer estável. Concomitantemente, a instabilidade mitótica dos Bs apresentou um significativo decréscimo, sugerindo a neutralização de um mecanismo de acúmulo desses cromossomos pela aquisição de uma estabilização mitótica (Cavallaro et al., 2000). De fato, a neutralização dos Bs pode ser também corroborada pela sua taxa de transmissão (K_B) em torno de 0,5, evidenciando um

comportamento Mendeliano desses cromossomos (Oliveira et al., 1997). No presente caso de *E. erythrinus* a variação numérica observada (Fig. 4) mostra que os Bs comportam-se como mitoticamente instáveis nesta espécie. De fato, foram observadas variações não só entre os diferentes espécimes analisados, como também entre as diferentes metáfases de um mesmo indivíduo.

As particularidades cromossômicas de cada um dos distintos cariomorfos e suas respectivas distribuições geográficas reforçam a proposta de que *E. erythrinus* deva corresponder a um complexo de espécies, onde a diversificação cariotípica foi determinada por diferentes rearranjos cromossômicos (Bertollo et al., 2004; Cioffi et al. 2010), assim como pela adição de micro-cromossomos extras, os quais são presentemente observados entre algumas populações de alguns cariomorfos. Ao que tudo indica, tais cromossomos parecem corresponder a uma característica basal deste grupo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e pela FAPEMAT (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso). Os autores também agradecem ao IBAMA pela autorização concedida (n^o10538-1), para a coleta de material ictiológico.

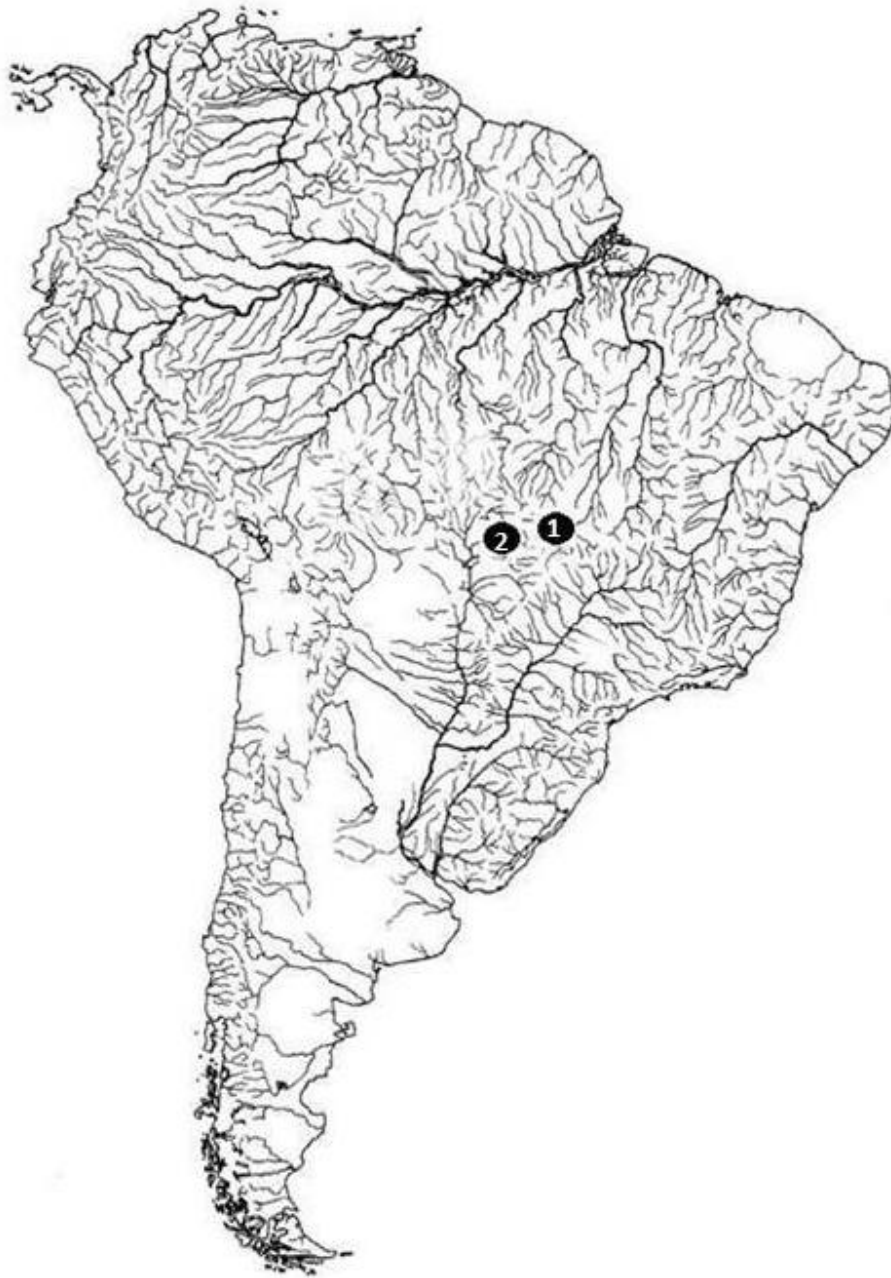


Fig. 1. Locais de coleta das amostras de *Erythrinus erythrinus* analisadas no presente estudo, provenientes do Pantanal Matogrossense, bacia do rio Paraguai. 1=Poconé (MT); 2=Barão de Melgaço (MT).

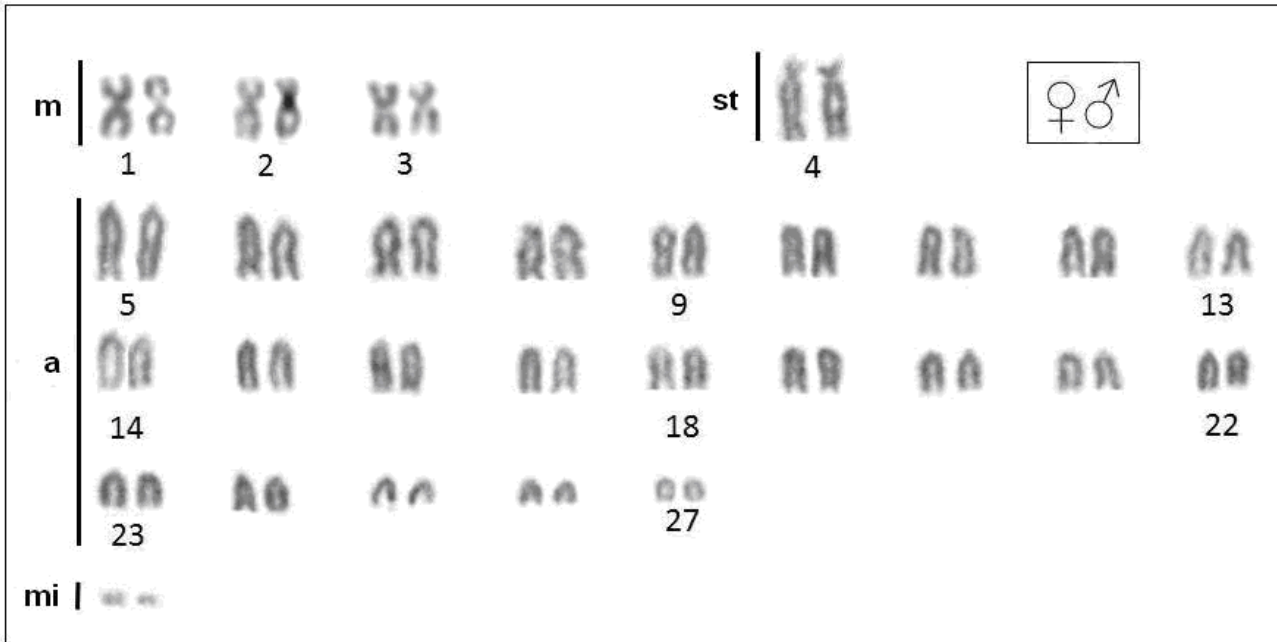


Fig. 2. Cariótipo de *Erythrinus erythrinus* representativo de machos e fêmeas das populações de Poconé e Barão de Melgaço (MT), com $2n=54$ cromossomos, evidenciando três pares metacêntricos (m), um par submetlocêntrico (st) e vinte e três pares acrocêntricos (a), além de dois pequenos microcromossomos Bs (mi).

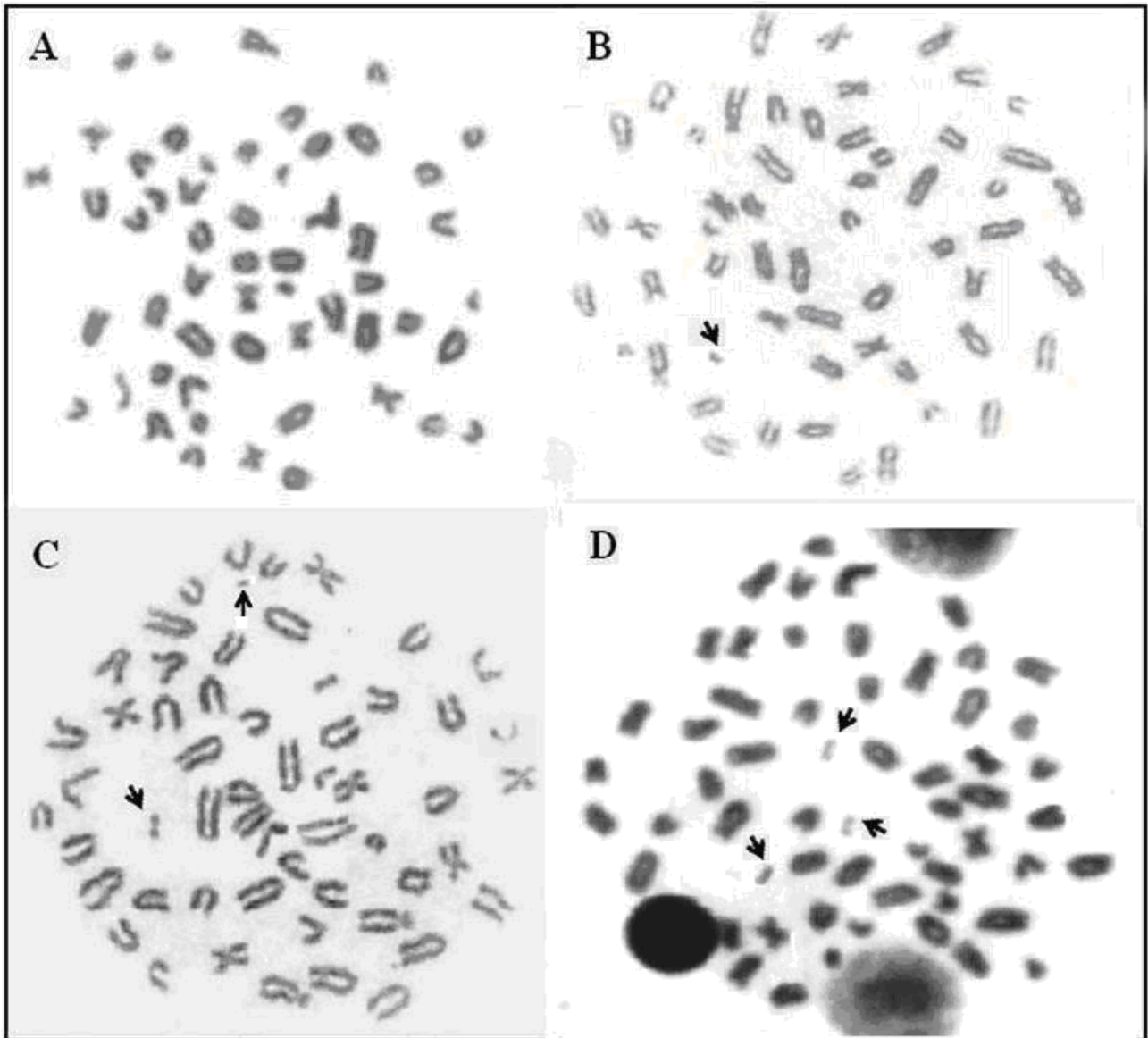


Fig. 3. Cromossomos metafásicos representativos das populações de *Erythrinus erythrinus* das populações de Poconé e Barão de Melgaço (MT), evidenciando em (A) a ausência de cromossomos B, em (B) um micro-cromossomo B, em (C) dois micro-cromossomos B e em (D) três micro-cromossomos B (setas).

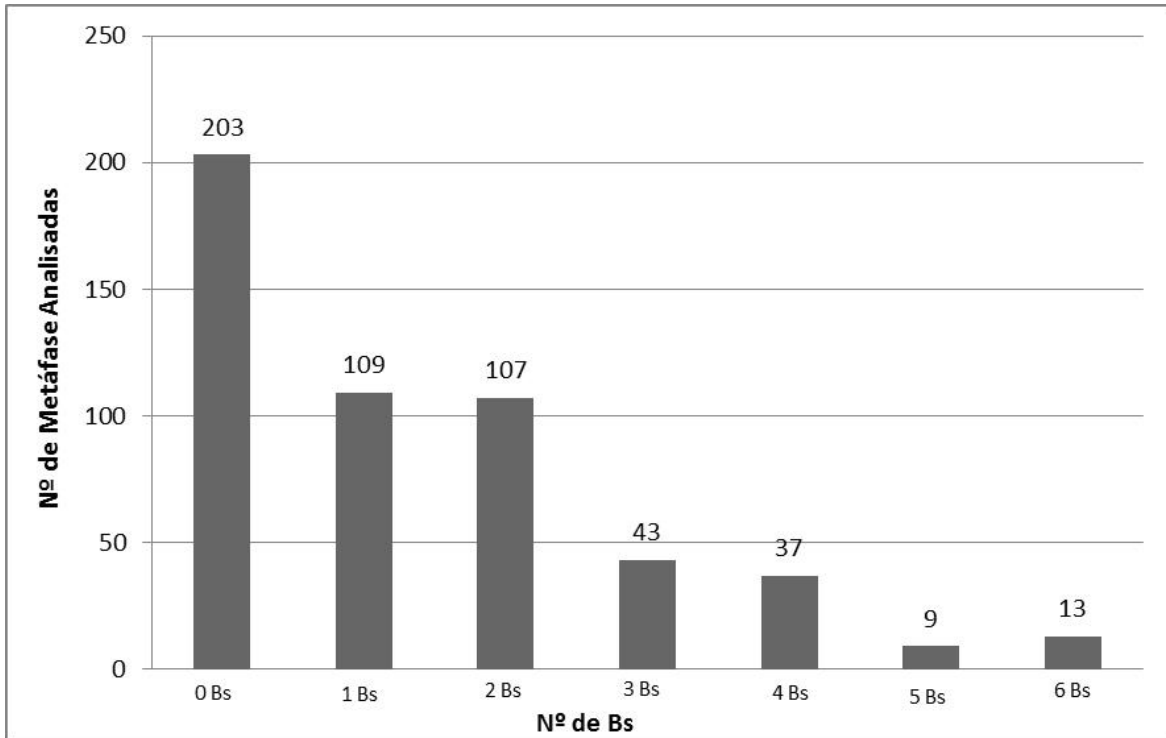


Fig. 4. Frequência de micro-cromossomos B encontrados nas populações de *Erythrinus erythrinus* de Poconé e Barão de Melgaço (MT). Observe a frequência maior de 1-2 Bs/célula, seguida pela frequência intermediária de 3-4 Bs e pela frequência menor de 5-6 Bs/célula.

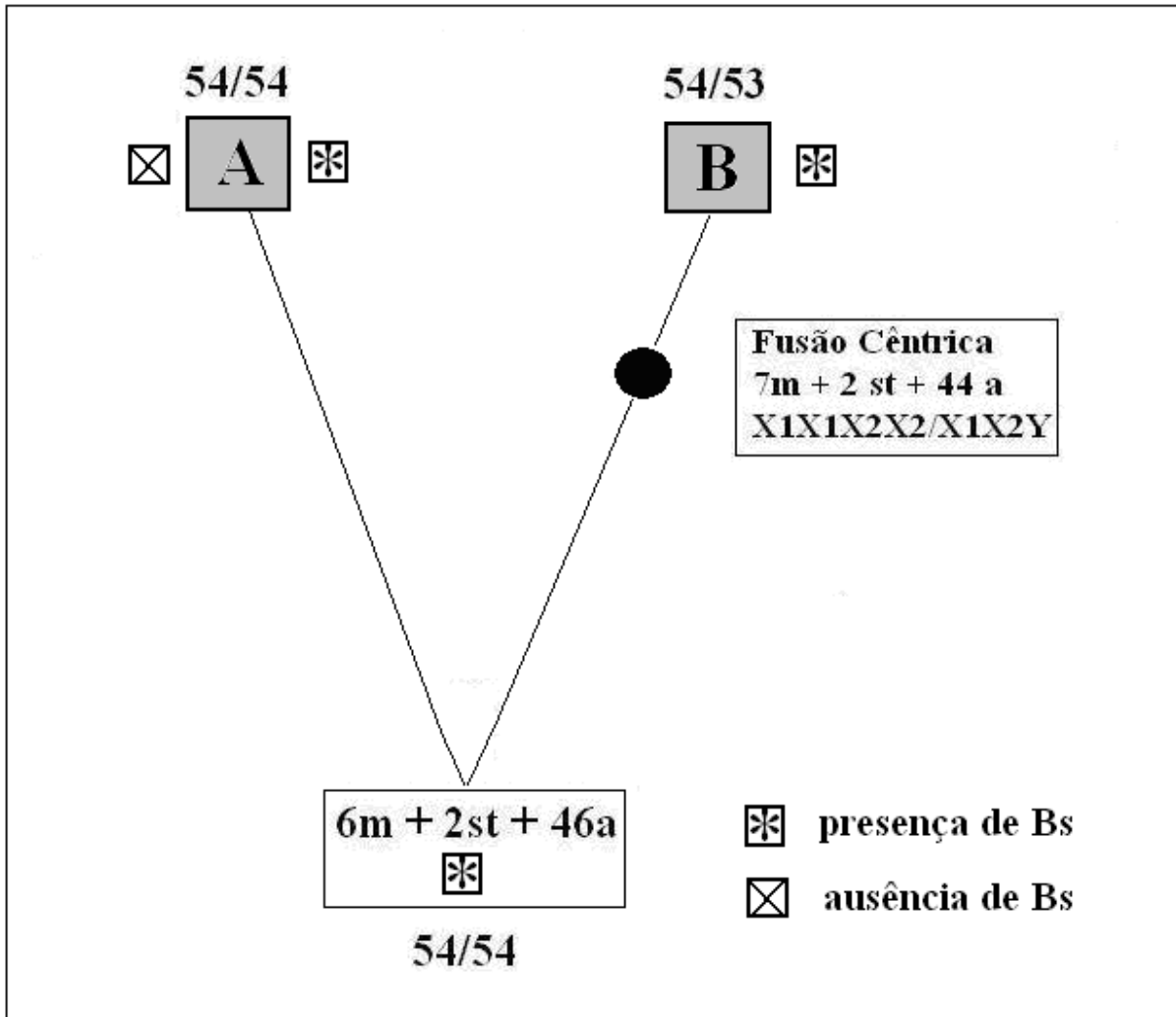


Fig. 5. Diferenciações evolutivas propostas para as populações de *Erythrinus erythrinus* dos cariomorfos A ($2n=54$ cromossomos, sem cromossomos sexuais diferenciados) e B ($2n=54$ cromossomos nas fêmeas, $X1X1X2X2$ e $2n=53$ cromossomos nos machos, $X1X2Y$), com base nas características cariotípicas. Observe a presença/ausência de micro-cromossomos B entre populações do cariomorfo A e o compartilhamento desses cromossomos por populações dos cariomorfos A e B.

Capítulo 2

Diferenciação e relações evolutivas em *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): mapeamento cromossômico comparativo de sequências repetitivas

**Nícolas Fernandes Martins • Luiz Antonio Carlos Bertollo • Waldo Pinheiro Troy
• Eliana Feldberg • Francisco Carlos de Souza Valentin • Marcelo de Bello Cioffi**

Artigo publicado na revista *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (2012)

DOI 10.1007/s11160-012-9292-4

Resumo

Erythrinus erythrinus apresenta diversidade cariotípica, com quatro cariomorfos (A-D) diferindo no número de cromossomos, na estrutura cariotípica e sistemas de cromossomos sexuais. O cariomorfo A tem $2n=54$ cromossomos nos machos e nas fêmeas, sem cromossomos sexuais heteromórficos, enquanto que o cariomorfo C tem $2n=52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos nos machos, devido a um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Três populações alopátricas do cariomorfo A e uma população do cariomorfo C foram presentemente investigadas por procedimentos de citogenética molecular, utilizando sondas de DNAs repetitivos. Os resultados obtidos reforçam a proximidade entre as populações do cariomorfo A, apesar de sua ampla distribuição geográfica. Entretanto, o cariomorfo C mostrou uma diferença acentuada na sua constituição genômica, especialmente em relação à quantidade e distribuição das sequências DNAr 5S e *Rex3* nos cromossomos. Embora os cariomorfos C e D compartilhem diversas características cariotípicas, ocorrem marcadores cromossômicos exclusivos que evidenciam os diferentes caminhos evolutivos entre eles. Assim sendo, além dos rearranjos cromossômicos clássicos, os DNAs repetitivos foram bons indicadores para evidenciar a biodiversidade desse grupo de peixes, assim como o seu relacionamento e a sua diferenciação. Os dados cromossômicos corroboram acentuadamente que *E. erythrinus* deve corresponder a um complexo de espécies, ao invés de uma única entidade biológica.

Palavras-chave:

Cariomorfos, evolução cariotípica, DNAs repetitivos, marcadores cromossômicos

Introdução

Os Erythrinidae constituem uma pequena família de peixes Neotropicais, caracterizada por uma grande diversidade cariotípica (Bertollo, 2007). Particularmente, no gênero *Erythrinus* já foram identificados quatro cariomorfos (A-D) na espécie nominal *E. erythrinus*, os quais diferem no número e na morfologia dos cromossomos e na ocorrência de cromossomos sexuais (Bertollo et al., 2004; Cioffi et al., 2010). O cariomorfo A tem $2n=54$ cromossomos ($6m + 2st + 46a$) nos machos e nas fêmeas, sem cromossomos sexuais heteromórficos. O cariomorfo B tem $2n=54$ cromossomos nas fêmeas e $2n=53$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 6m + 2st + 42a + X1X1X2X2$; $\text{♂ } 6m + 2st + 42a + X1X2Y$). O cariomorfo C tem $2n=52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 6m + 2sm + 6st + 34a + X1X1X2X2$; $\text{♂ } 6m + 2sm + 6st + 34a + X1X2Y$). O cariomorfo D tem $2n=52$ cromossomos nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos nos machos ($\text{♀ } 4m + 2sm + 2st + 40a + X1X1X2X2$; $\text{♂ } 4m + 2sm + 2st + 40a + X1X2Y$). Em todos os casos, o cromossomo Y é um grande metacêntrico, o maior do conjunto cromossômico. Bertollo et. al. (2004) propuseram que o cromossomo foi originado a partir de uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos não-homólogos. Consequentemente, os cromossomos acrocêntricos desprovidos de homólogos no cariótipo do macho correspondem aos cromossomos X1 e X2.

É bem conhecido que uma fração substancial do genoma eucariótico consiste de sequências de DNAs repetitivos, incluindo satélites, minissatélites, microssatélites e elementos transponíveis (Jurka et al., 2005; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). O mapeamento cromossômico dessas sequências repetitivas com o emprego da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem propiciado um panorama bastante informativo sobre a organização genômica e a caracterização da biodiversidade (Cioffi et al., 2012a).

Algumas classes de DNAs repetitivos já foram previamente utilizadas, fornecendo informações relevantes sobre a diversificação cariotípica em *E. erythrinus*. De fato, o uso de sondas teloméricas claramente evidenciou que o grande cromossomo Y do cariomorfo D possui um sítio telomérico intersticial característico (ITS) na sua região centromérica (Cioffi et al., 2010), confirmando assim a proposta prévia sobre a origem desse cromossomo. Uma notável dispersão do retrotransposon *Rex3*, co-localizado com sítios de DNAr 5S, foi também detectada na região centromérica de até 22 cromossomos do cariomorfo D. Foi proposto que este elemento transponível se inseriu na sequência de DNAr 5S e que o complexo DNAr 5S/*Rex3* se dispersou pelo cariótipo (Cioffi et al., 2010). Adicionalmente, a pintura cromossômica com sondas derivadas da microdissecção do cromossomo Y indicou que o sistema X1X2Y se derivou de um sistema simples, XY, ainda morfologicamente indiferenciado, presente no cariomorfo A (Cioffi et al., 2011).

No presente estudo, três populações alopátricas do cariomorfo A e uma população do cariomorfo C de *E. erythrinus* foram analisadas mais pormenorizadamente. Análises de citogenética molecular foram empregadas objetivando a obtenção de marcadores cromossômicos para uma genômica comparativa em nível cromossômico. Os dados obtidos evidenciaram características únicas e compartilhadas entre as populações e/ou cariomorfos, destacando suas inter-relações e diferenciações, fornecendo novas informações sobre a evolução cariotípica deste grupo.

Material e métodos

Espécimes e preparações cromossômicas

Amostras de *E. erythrinus* de três populações do cariomorfo A e uma população do cariomorfo C foram obtidas de distintas bacias hidrográficas (Figura 1, Tabela 1). A população proveniente da região de Barão de Melgaço (MT) foi analisada pela primeira vez, As demais populações foram previamente analisadas apenas por procedimentos citogenéticos clássicos.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensões celulares do rim anterior, usando o método convencional de “air-drying” (Bertollo et al., 1978). Aproximadamente 30 metáfases por espécime foram analisadas para a confirmação do número diploide e da estrutura cariotípica. As imagens foram capturadas pelo sistema CoolSNAP, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), acoplado a um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com a relação de braços (Levan et al., 1964).

Sondas cromossômicas e experimentos de FISH

Foram utilizadas duas sequências repetitivas de DNA, isoladas do genoma de outra espécie de Erythrinidae, *Hoplias malabaricus*. A primeira sonda, de DNAr 5S, incluiu 120 pares de bases deste gene e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito

(NTS) (Martins et al., 2006). A segunda sonda correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene do RNAr 18S, obtida por PCR a partir de DNA nuclear (Cioffi et al., 2009). Ambas as sondas foram clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em células competentes de *Escherichia coli* (Invitrogen, San Diego, CA, USA). O retroelemento *Rex3* foi obtido por PCR, diretamente do genoma de *E. erythrinus* (Cioffi et al., 2010). A sonda de DNAr 5S foi marcada com biotina-14-dATP por “nick translation”, conforme as recomendações do fabricante (BioNickTMLabeling System; Invitrogen, San Diego, CA, USA). As sondas de DNAr 18S e *Rex3* foram marcadas por “nick translation” com DIG-11-dUTP, conforme as instruções do fabricante ((Roche, Mannheim, Germany). A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada sob condições de alta estringência (Pinkel et al., 1986). As lâminas com os cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (40 µg/ml) por 1h50min a 37 °C. Após a desnaturação do DNA cromossômico durante 3min em formamida 70%/2 x SSC por 4min a 70 °C, as preparações foram incubadas em 2 x SSC por 4min a 70 °C. A mistura de hibridização (2,5 ng/µl de sonda, 2µg/µl de DNA de esperma de salmão, 50% de formamida deionizada, 10% de sulfato de dextrano, pH 7,0) foi adicionada sobre as lâminas, (overnight), a 37°C, em câmara úmida contendo 2 x SSC. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em um “shaker” (150 rpm) a 37°C. A primeira lavagem foi realizada em formamida 50%/2 x SSC (pH 7,5) por 15 min., seguindo-se a segunda lavagem em 2 x SSC por 15 min. Uma lavagem final foi realizada em temperatura ambiente, em 2 x SSC por 15 min. Avidina-FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi

utilizada para a detecção dos sinais da sonda de DNAr 5S e anti-digoxigenina- rodamina (Roche, Mannheim, Germany) para a detecção dos sinais das sondas de DNAr 18S e *Rex3*. Os experimentos de FISH com as sondas dos microssatélites d(CA)₁₅ e d(GA)₁₅ foram realizados basicamente conforme descrito em Kubat et al. (2008). Estas sequências foram marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (1,2 µg/ml) e a preparações montadas em solução de “antifading” (Vector, Burlingame, CA, USA) e analisadas em microscópio Olympus BX50 (Olympu Corporation, Ishikawa, Japan).

Resultados

Cariótipos

Os cariótipos das quatro populações apresentaram as características gerais que distinguem os *Erythrinus* dos demais Erithrinidae, ou seja, um grande número de cromossomos acrocêntricos e poucos cromossomos portadores de dois braços. As amostras de Barão de Melgaço (MT), Birigui (SP) e Resistência (AR) mostraram $2n=54$ cromossomos ($6 m + 2 st + 46 a$), sem cromossomos sexuais diferenciados, o que caracteriza o cariomorfo A (Fig. 2).

A amostra de Manaus (AM) apresentou $2n=52$ cromossomos ($6m + 2sm + 6st + 34a + X1X1X2X2$) nas fêmeas e $2n=51$ cromossomos ($6m + 2sm + 6st + 34a + X1X2Y$) nos machos. Esta estrutura cariotípica caracteriza o cariomorfo C (Fig. 2). Os cromossomos X1 e X2 foram tentativamente identificados conforme resultados prévios obtidos para o cariomorfo D, o qual apresenta o mesmo sistema $X1X1X2X2/X1X2Y$.

Mapeamento cromossômico dos sítios de DNAr 18S, DNAr 5S e *Rex3*

Os resultados obtidos apresentaram o mesmo padrão de distribuição nos cromossomos em todas as populações analisadas do cariomorfo A. Assim sendo, estão sendo apresentados apenas os resultados obtidos com a população de Barão do Melgaço, como representativa das demais populações do cariomorfo A. Um padrão similar de distribuição dos sítios de DNAr 18S foi encontrado nos cariomorfos A e C. Quatro pares acrocêntricos apresentam sítios de DNAr 18S na região terminal dos

braços longos ou curtos, em adição a um par cromossômico com sítios bi-teloméricos. Por sua vez, os sítios de DNAr 5S apresentaram uma distribuição bastante distinta (Fig. 2). O cariomorfo A apresenta apenas um par acrocêntrico com DNAr 5S na região telomérica dos braços curtos. Este mesmo par cromossômico também apresenta DNAr 18S nos braços longos, evidenciando assim uma condição sintênica entre essas duas classes de DNAs ribossomais. Esta mesma sintenia é compartilhada pelo cariomorfo C, embora sendo aqui também encontrada em um outro par adicional de cromossomos (Fig. 2). Adicionalmente, vários cromossomos acrocêntricos apresentam sítios de DNAr 5S neste cariomorfo, totalizando 14 pares nas fêmeas e 12 pares mais os cromossomos X1,X2 e Y nos machos. Em todos os cromossomos, a sequência de DNAr 5S está localizada na região telomérica dos braços curtos, exceto no cromossomo Y onde ela é encontrada na região centromérica (Fig. 2). Em ambos cariomorfos, há uma clara co-localização do elemento transponível *Rex3* e os sítios de DNAr 5S, conforme demonstrado mapeamento utilizando dupla FISH (Fig. 2).

Mapeamento cromossômico das repetições de microssatélites

Os microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ mostram-se abundantemente distribuídos em todos os cromossomos do cariomorfo A. Sítios mais conspícuos são encontrados nas regiões teloméricas dos cromossomos, mas sítios intersticiais evidentes podem ser também observados (Fig. 3). Um padrão similar de distribuição para estes microssatélites é também verificado no cariomorfo C, sem diferenças significativas

entre machos e fêmeas. O cromossomo Y, metacêntrico, apresenta sítios conspícuos intersticiais para ambos os microssatélites, assim como outros cromossomos acrocêntricos do complemento (Fig. 3).

Discussão

Mapeamento cromossômico dos sítios de DNAr 18S e 5S e *Rex3*

A investigação das cinco classes de DNAs repetitivos empregados neste estudo forneceu resultados bastante informativos para uma genômica comparativa em nível cromossômico, com novas informações importantes sobre a evolução cariotípica de *E. erythrinus*. Embora os cariomorfos A e C compartilhem uma distribuição similar dos sítios de DNAr 18S, este último apresenta uma considerável diferença na sua constituição referente às sequências de DNAr 5S e *Rex3*. De fato, enquanto que o cariomorfo A apresenta apenas um único par de cromossomos acrocêntricos portador de DNAr 5S, o qual é co-localizado com o retroelemento *Rex3*, no cariomorfo C ocorrem 27 cromossomos nos machos e 28 cromossomos nas fêmeas portadores desses sítios co-localizados (Fig. 2). É também significativo o fato de que este mesmo cenário é encontrado no cariomorfo D (Cioffi et al., 2010), embora diferindo no número de cromossomos portadores desse complexo 5S rDNA-*Rex3*, ou seja, 21/22 cromossomos no cariomorfo D e 27/28 cromossomos no cariomorfo C (Figs. 2 e 4).

A heterocromatina apresenta uma composição complexa de vários tipos de sequências repetitivas (Charlesworth et al., 1994; Kidwell, 2002). A reorganização cromossômica pode alterar o número e a posição destas sequências, possibilitando um dinamismo intragenômico durante o processo evolutivo. Portanto, uma diferenciação na quantidade e na distribuição da fração heterocromática do genoma pode usualmente ocorrer, como em muitas espécies de peixes (Cioffi e Bertollo, 2012). Sob a ótica da

hipótese parasítica, os elementos repetitivos poderiam se acumular na heterocromatina porque há poucos genes nesta região (Horvath et al., 2001; Grewal e Jia 2007) e, portanto, os elementos inseridos seriam provavelmente menos deletérios e teriam mais chance de se acumularem (Biémont e Vieira, 2006). Entretanto, a dinâmica desta acumulação, as especificidades de posição e localização das diferentes sequências, bem como os possíveis papéis que os elementos repetitivos poderiam desempenhar dentro da heterocromatina se contrapõem a esta visão (Dimitri e Junakovic, 1999). Antes de representar apenas uma fração de DNA lixo, o acúmulo de DNA repetitivo na heterocromatina pode corresponder à uma importante interação evolutiva entre os componentes do genoma (Grewal e Jia, 2007). De fato, nossos resultados em relação ao mapeamento e distribuição das sequências de DNA r 5S e *Rex3* nos cromossomos de *E. erythrinus* mostram o dinamismo destes elementos repetitivos nesta espécie, dando suporte à visão de que eles representam componentes relevantes do genoma intermediando a diferenciação genética durante o processo evolutivo.

Mapeamento cromossômico das sequências de microssatélites

Os microssatélites são sequências repetitivas abundantes em todos os genomas eucarióticos até então estudados, sendo encontradas tanto entre as regiões codificadoras dos genes estruturais como entre outras sequências repetitivas (Tautz e Renz, 1984). Uma das propriedades mais importantes destas sequências é sua habilidade de originar variantes com um número diferente de repetições. Além disso, os microssatélites podem

estar organizados em longos segmentos constituídos por centenas e até milhares de unidades de repetições em tandem, associados com a heterocromatina constitutiva de muitas espécies (revisão em Martins, 2007). No genoma dos peixes, os microssatélites estão usualmente localizados nos telômeros, centrômeros, assim como nos cromossomos sexuais, onde uma significativa fração do DNA repetitivo é também encontrada (Cioffi e Bertollo, 2012).

Nos *Erythrinus*, ambas as sondas dos microssatélites empregados [(CA)₁₅ e (GA)₁₅] geraram sinais evidentes nas regiões eucromáticas e heterocromáticas dos cromossomos, mas com uma localização preferencial na heterocromatina (Fig. 3). Estes segmentos repetidos foram também localizados em outras espécies de peixes, como em *Imparfinis schubarti*, *Steindachneridion scripta* e *Rineloricaria latirostris* (Loricariidae), com um considerável acúmulo do microssatélite (GA)₁₅ nas regiões teloméricas (Vanzela et al., 2002). Além disso, no “zebrafish” (*Danio rerio*) e na sardinha de água doce (*Triportheus auritus*), ambas as sondas (CA)₁₅ e (GC)₁₅ foram preferencialmente localizadas nas regiões centroméricas e teloméricas (Shimoda et al., 1999; Cioffi et al., 2012b). Este acúmulo preferencial pode indicar uma região cromossômica particular onde os microssatélites estão presentes como grandes arranjos perfeitos ou degenerados.

Apesar da distribuição geral similar em ambos os cariomorfos, os dois microssatélites mostraram sítios intersticiais conspícuos no braço longo do cromossomo Y no cariomorfo C. Contudo, tais sítios são também encontrados em outros

cromossomos acrocêntricos do conjunto cromossômico, sendo mais frequentes para o microssatélite (GA)15 (Fig. 3). A análise comparativa entre os cariótipos de machos e fêmeas claramente indica que o grande cromossomo Y, metacêntrico, encontrado nos cariomorfos B-D de *E. erythrinus* foi originado por uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos não homólogos (Bertollo et al., 2004). Embora ainda não tenha sido caracterizado nenhum marcador específico para identificar estes cromossomos acrocêntricos, aqueles portadores dos sítios microssatélites intersticiais são bons candidatos como tais cromossomos. De fato, há uma boa correspondência entre esses sítios e aqueles localizados no cromossomo Y (Fig. 3).

Interações e diferenciação dos cariomorfos

Os principais passos demonstrando a diferenciação e as inter-relações entre os cariomorfos A-D de *E. erythrinus* estão apresentados na Fig. 4. Foi previamente considerado que o cariomorfo A ($2n=54$ cromossomos nos machos e nas fêmeas e ausência de cromossomos sexuais heteromórficos) representa o cariótipo provavelmente basal a partir do qual os demais cariomorfos teriam se diferenciado. Assim, alguns rearranjos cromossômicos, tais como fusões cêntricas e inversões pericêntricas, deram origem ao sistema de cromossomos sexuais $X1X2Y$ que ocorre nos cariomorfos B-D, assim como às suas distintas fórmulas cariotípicas (Bertollo et al., 2004).

Embora não tenhamos informações adicionais sobre o cariomorfo B, a ocorrência de marcadores cromossômicos compartilhados pelos cariomorfos A, C e D permitem

inferir sobre a ancestralidade destas características dentro do grupo. Este é o caso dos sítios bi-teloméricos de DNAr 18S (sítios localizados em ambas regiões teloméricas do mesmo cromossomo), os sítios de DNAr 5S + *Rex3* conjugados, assim como da condição sintênica dos sítios 18S + 5S/*Rex3*. Por sua vez, a dispersão dos sítios 5S/*Rex3* é encontrado no genoma dos cariomorfos C e D, portanto representando uma condição sinapomórfica para estes cariomorfos. Entretanto, o cariomorfo C apresenta também características exclusivas, como a dispersão adicional dos sítios 5S/*Rex3* em mais três pares cromossômicos e uma sentença 18S + 5S/*Rex3* adicional em mais um par de cromossomos comparativamente ao cariomorfo D.

Fica evidente que a dispersão genômica dos elementos transponíveis *Rex3* conjugados aos sítios de DNAr 5S se encontra estreitamente associada com a evolução de ambos os cariomorfos C e D. Em ambos, todos os sítios de DNAr 5S estão co-localizados com os elementos *Rex3*, mostrando um aumento notável desses sítios em contraste com o cariomorfo A. Considerando que os cariomorfos C e D representam formas derivadas em relação ao cariomorfo A, os resultados claramente demonstram uma ampla dispersão desses elementos na região centromérica de cromossomos acrocêntricos. Portanto, é provável que sequências do retroelemento *Rex3* tenham se inserido no DNAr 5S e se dispersado no cariótipo (Cioffi et al., 2010). Além disso, o sítio 5S/*Rex3* centromérico, presente no grande cromossomo Y metacêntrico, reforça a sua origem por uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos.

Conclusões

Além de rearranjos cromossômicos clássicos, tais como inversões pericêntricas e fusões cêntricas, os DNAs repetitivos desempenharam um importante papel na diferenciação dos cariomorfos de *E. erythrinus*, conforme evidenciado pela presença e distribuição de sequências marcadoras nos cromossomos. O cenário encontrado em *E. erythrinus* destaca a utilidade do emprego de sequências repetitivas para evidenciar a diversidade existente entre os peixes e a compreensão da estrutura genômica e evolução desse grupo. De fato, o mapeamento dessas sequências destacou características únicas ou compartilhadas entre os cariomorfos, indicando os caminhos evolutivos durante a sua diferenciação. As características similares compartilhadas pelas populações do cariomorfo A reforçam a proposta de que elas constituem uma unidade evolutiva, apesar dos isolamentos existentes entre diferentes bacias hidrográficas onde elas ocorrem. Por outro lado, embora dos cariomorfos C e D também compartilhem diversas características cariotípicas, alguns marcadores exclusivos mostram os caminhos evolutivos distintos entre eles. Assim sendo, embora não ocorram características morfológicas conspícuas facilmente detectáveis entre as distintas populações, o conjunto das características cromossômicas corroboram fortemente que *E. erythrinus* corresponde a um complexo de espécies ao invés de uma única entidade biológica.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e pela FAPEMAT (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso). Os autores também agradecem ao IBAMA pela autorização concedida (n^o10538-1), para a coleta de material ictiológico.

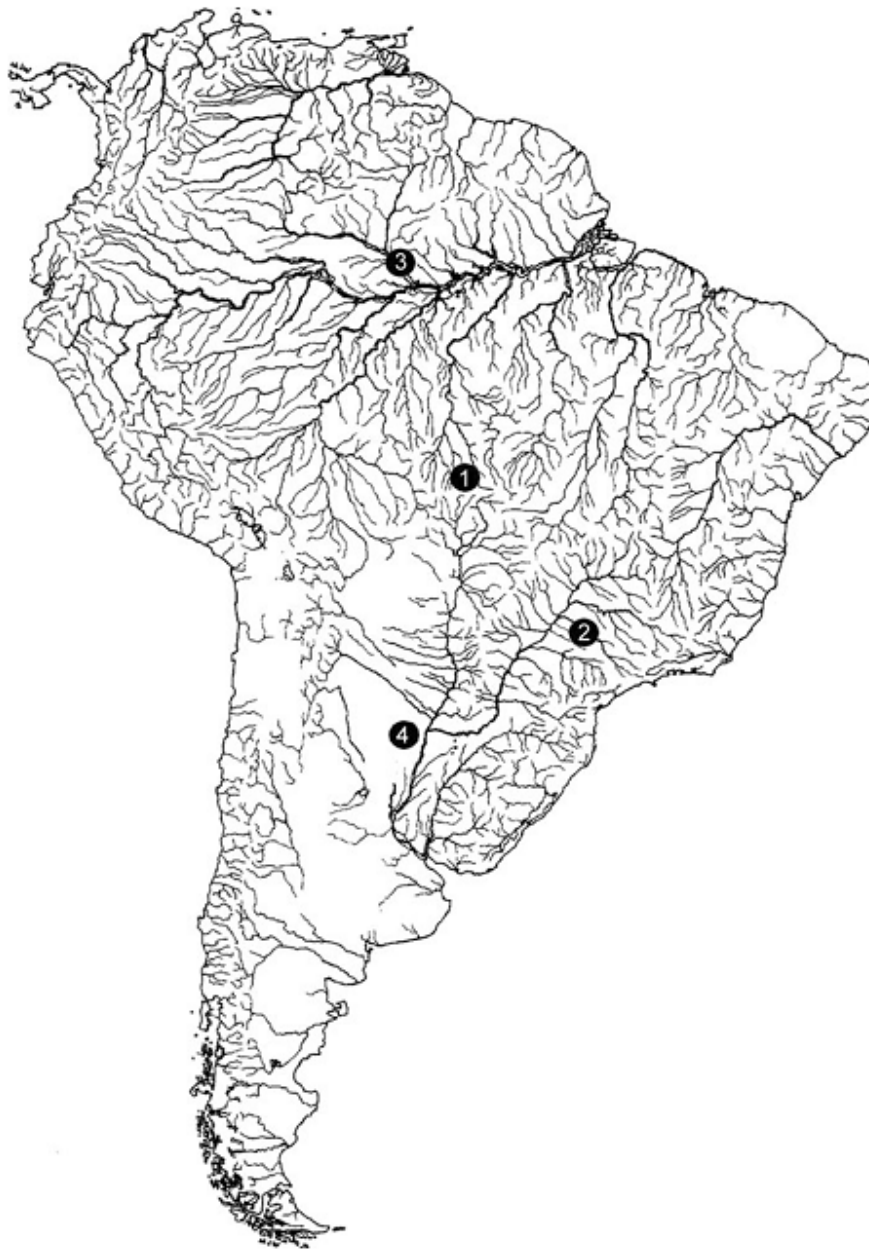


Fig. 1. Locais de coleta das amostras de *Erythrinus erythrinus* do Brasil (1. Barão de Melgaço, MT; 2. Birigui, SP; 3. Manaus, AM e Argentina (4. Resistência).

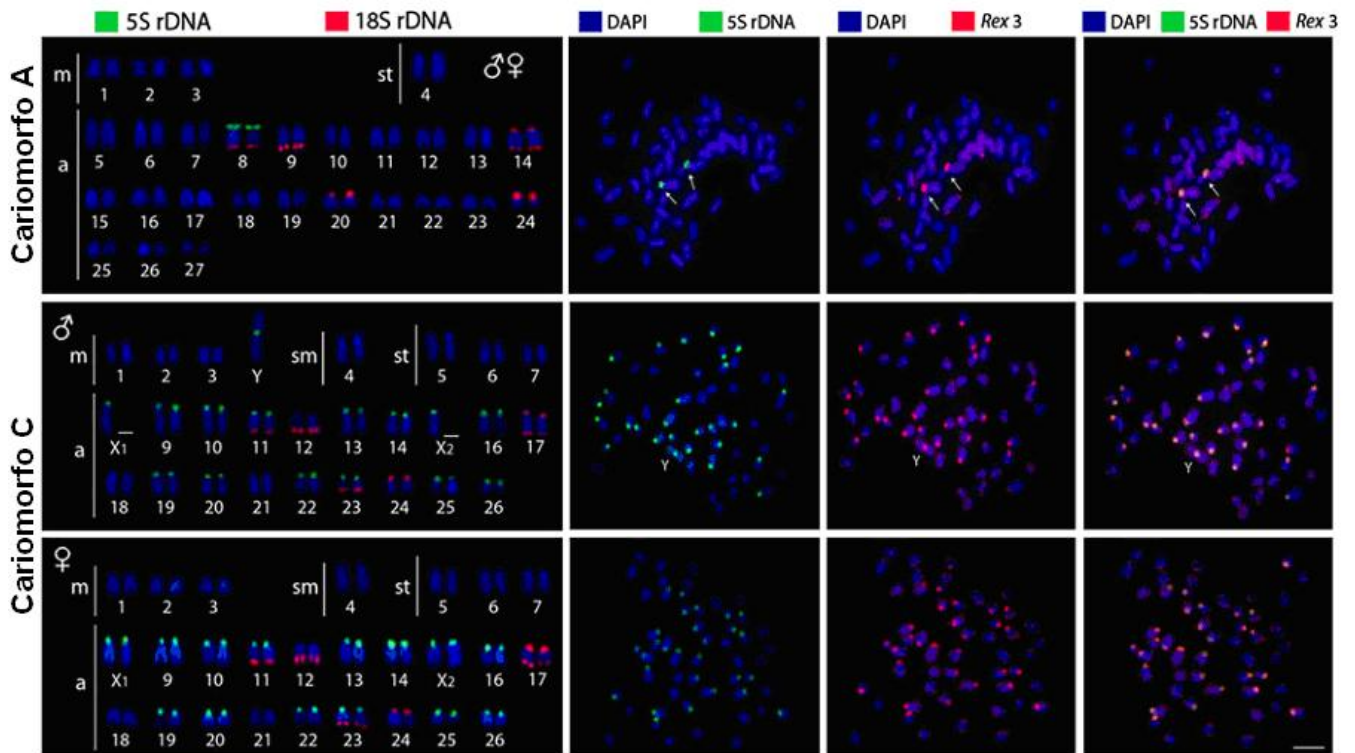


Fig. 2. Cariótipos de machos e fêmeas dos cariomorfos A e C sob diferentes metodologias de análises. Os cromossomos foram submetidos à hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 5S, DNAr 18S e de elementos retrotransponíveis *Rex3* e contra-corados com DAPI. A co-localização dos sítios 5S e *Rex3* está indicada por setas nas figuras metafásicas. Observar o espalhamento significativo dos sítios conjugados DNAr 5S/*Rex3* no cariomorfo C. m=cromossomos metacêntricos; sm=cromossomos submetacêntricos; st=cromossomos subtelo-cêntricos, a=cromossomos acrocêntricos. Barra=5 μ m.

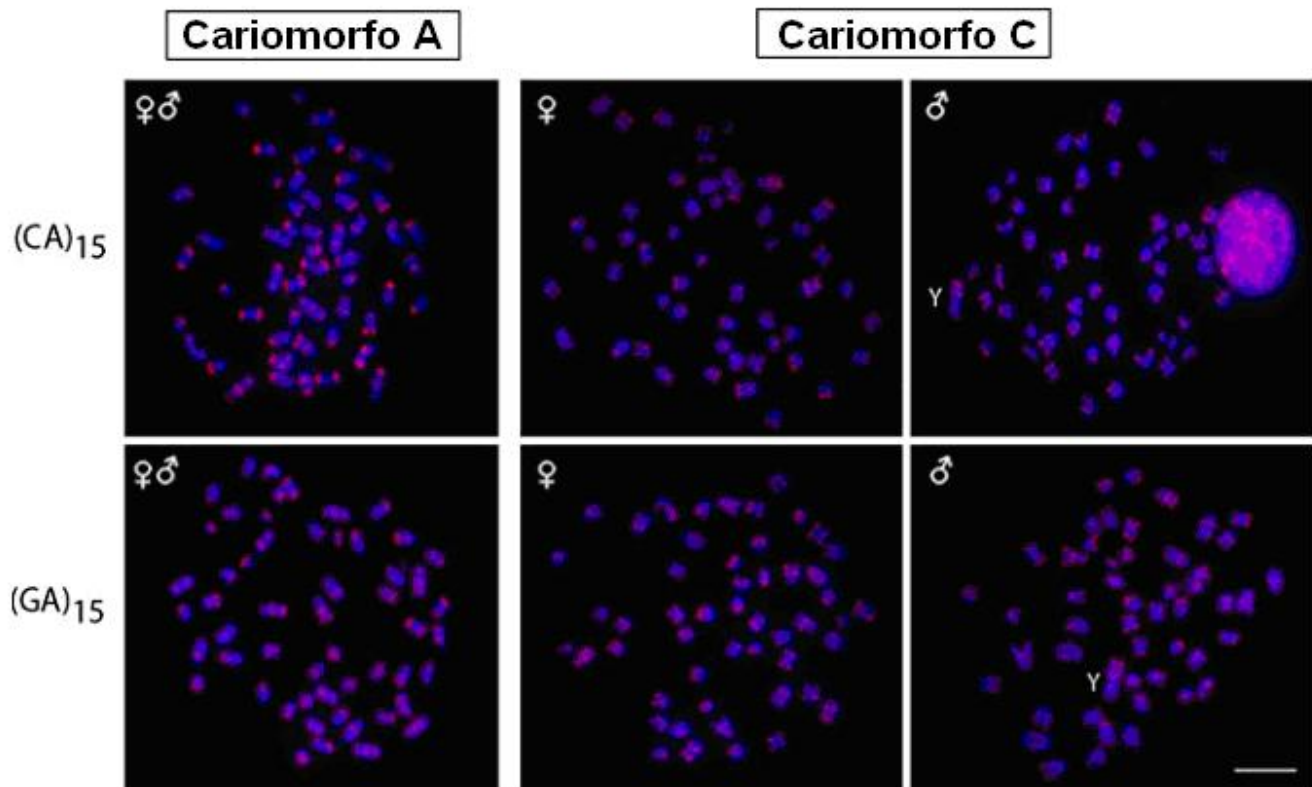


Fig. 3. Cromossomos metafásicos de machos e fêmeas dos cariomorfos A e C hibridizados com sondas dos microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅, mostrando o padrão de distribuição geral dessas repetições nos cromossomos. O grande cromossomos Y do cariomorfo C está indicado. Barra = 5 µm.

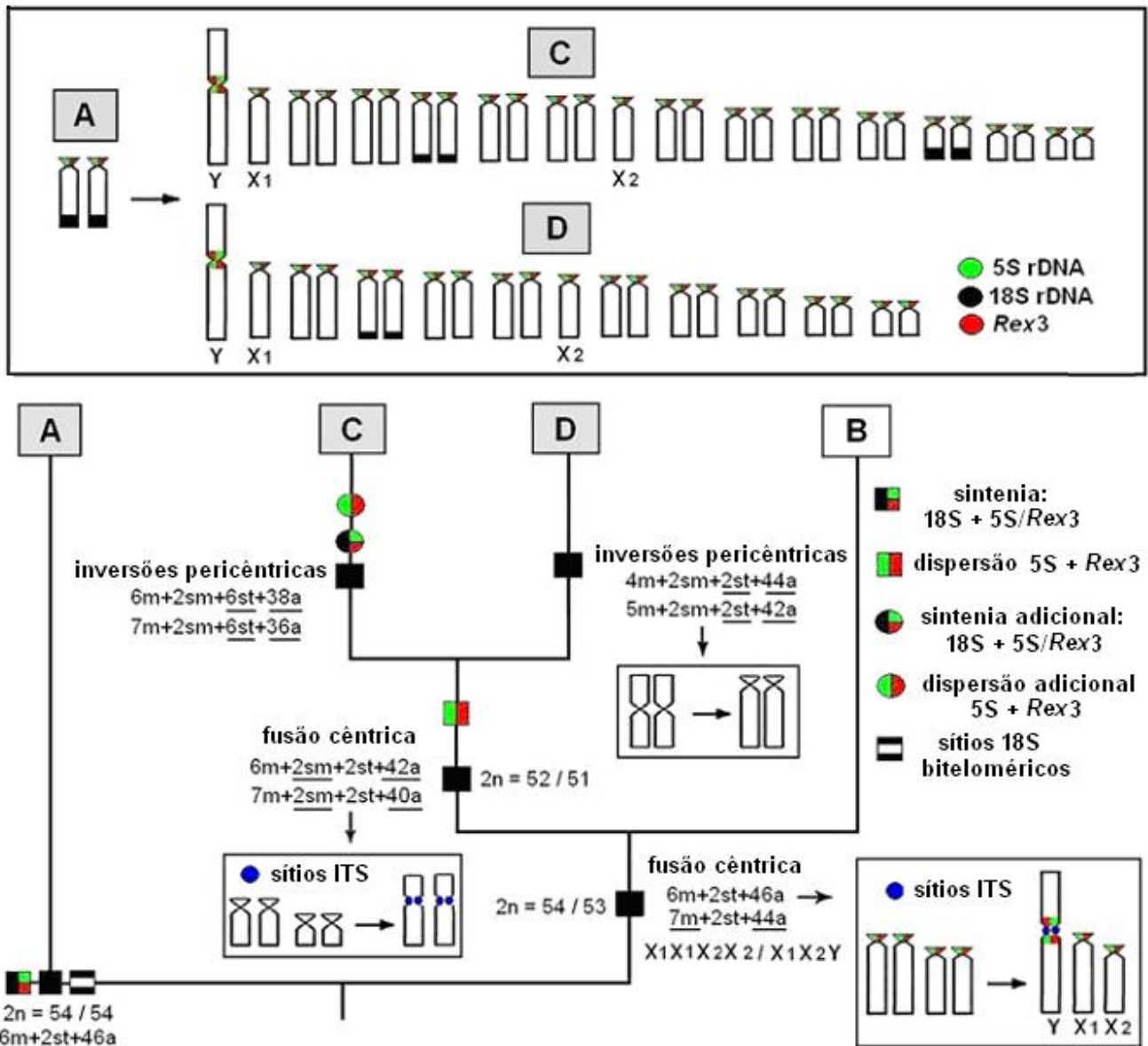


Tabela 1. Regiões de coleta de *Erythrinus erythrinus* com os respectivos cariomorfos e fórmulas cromossômicas.

Região de coleta	Cariomorfo	2n	Fórmula cromossômica
Barão de Melgaço (MT)	A (10 ♀; 08 ♂)	♀♂ 54	6m + 2st + 46a
Birigui (SP)	A (06 ♀; 04 ♂)	♀♂ 54	6m + 2st + 46a
Resistencia (AR)	A (12 ♀; 05 ♂)	♀♂ 54	6m + 2st + 46a
Manaus (AM)	C (05 ♀; 06 ♂)	♀ 52 ♂ 51	6m + 2sm + 6st + 34a + X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ 6m + 2sm + 6st + 34a + X ₁ X ₂ Y

Os pontos 1-4 correspondem à localização de cada região de coleta mostrada na Fig. 1. MT = Mato Grosso, SP = São Paulo, AM = Amazonas, AR = Argentina; 2n = número diplóide; m = cromossomos metacêntricos, sm = cromossomos submetacêntricos, st = cromossomos subtelocêntricos, a = cromossomos acrocêntricos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta desta dissertação foi investigar a estrutura cariotípica de algumas populações de *E. erythrinus*, especificamente dos cariomorfos A e C. Além das análises de citogenética convencional, foi realizado o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas de DNAs pela hibridização fluorescente in situ (FISH). Os dados obtidos possibilitaram a melhor compreensão dos processos evolutivos relacionados à evolução cromossômica desse grupo de Erythrinidae.

Foram analisadas as populações alopátricas de *E. erythrinus* correspondentes ao cariomorfo A de Poconé (MT) e Barão de Melgaço (MT), com $2n = 54$ ($6m + 2st + 46a$) e sem diferenciação de cromossomos sexuais, e o cariomorfo C de Manaus (AM), com $2n=52/51$ ($\text{♀ } 6m + 2sm + 6st + 38a$; $\text{♂ } 7m + 2sm + 6st + 36a$), com um sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. As duas populações do cariomorfo A apresentam a mesma constituição cariotípica de outras populações já analisadas deste mesmo cariomorfo, apesar da sua ampla distribuição geográfica. De fato, o cariomorfo A apresenta-se mais distribuído em relação aos cariomorfos B, C e D, tendo sido detectado em diferentes regiões do Brasil (Estados de São Paulo e Mato Grosso) e da Argentina, enquanto que os demais cariomorfos apresentam, até então, uma distribuição mais pontual em algumas localidades do Brasil.

Nas duas populações do cariomorfo A foi também constatada a presença de micro-cromossomos acessórios, com aparência de “double minutes”, menos corados que os demais cromossomos permanentes do cariótipo. Seu número mostrou-se variável,

tanto intra- como inter-individualmente, de zero a seis por célula, evidenciando que esses cromossomos são mitoticamente instáveis. Entretanto, sua ocorrência não é exclusividade do cariomorfo A, visto que já foram também observados no cariomorfo B de *E. erythrinus*. O cariomorfo A provavelmente corresponde à condição cariotípica ancestral em *E. erythrinus*, a partir do qual teriam se diversificado os demais cariomorfos conhecidos. Assim, a ocorrência de micro-cromossomos B idênticos entre diferentes cariomorfos indica que esta característica seja provavelmente basal neste grupo. Embora estes cromossomos adicionais tenham sido detectados apenas em populações dos cariomorfos A e B, tal fato não exclui que os mesmos possam ser também encontrados em outras populações, incluindo os cariomorfos C e D.

Além dos rearranjos cromossômicos clássicos, os DNAs repetitivos também desempenharam um importante papel na diferenciação dos cariomorfos de *E. erythrinus*. O mapeamento dessas sequências mostra características únicas ou compartilhadas entre os cariomorfos, reforçando os prováveis caminhos evolutivos ocorridos durante a diferenciação dos cariomorfos. Alguns destes marcadores são nitidamente basais para o grupo, já estando presente no cariomorfo A, como os sítios biteloméricos de DNAr 18S e a sintonia entre sítios cromossômicos de DNAr 18S + DNAr 5S/*Rex3*, os quais são também compartilhados por outros cariomorfos. Entretanto, uma sintonia adicional destes elementos repetitivos apresenta-se exclusiva para o cariomorfo C, evidenciando o dinamismo destes componentes do genoma ao longo do processo evolutivo desse grupo.

Entretanto, tal dinamismo é bem mais marcante no que se refere ao surpreendente processo de dispersão apresentado pelos sítios conjugados de DNAr 5S/*Rex3* no genoma dos cariomorfos C e D. De fato, tais sítios presentes em apenas um dos pares cromossômicos do cariomorfo A encontram-se presentes em inúmeros pares de cromossomos nos cariomorfos C e D, evidenciando dispersões adicionais também exclusivas no cariomorfo C. É provável que sequências do retroelemento *Rex3* tenham se inserido no DNAr 5S e se dispersado no cariótipo. Além disso, o sítio 5S/*Rex3* centromérico, presente no grande cromossomo Y metacêntrico, reforça a sua origem por uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos. Embora a associação dos sítios DNAr 5S/*Rex3* também corresponda à uma característica ancestral em *E. erythrinus*, a dispersão desses sítios no genoma é, nitidamente, uma característica derivada nos cariomorfos C e D.

Por sua vez, as repetições microssatélites (CA)₁₅ e (GA)₁₅ mostraram-se abundantemente distribuídas em todos os cromossomos do cariomorfo A. Sítios mais conspicuos foram encontrados nas regiões teloméricas dos cromossomos, mas sítios intersticiais puderam ser também observados. Um padrão similar de distribuição para estes microssatélites também ocorre no cariomorfo C, sem diferenças significativas entre machos e fêmeas. O cromossomo Y, metacêntrico, apresenta sítios conspicuos intersticiais para ambos os microssatélites, assim como outros cromossomos acrocêntricos do complemento.

O conjunto dos dados até então obtidos evidenciam que vários fatores participaram da diferenciação cariotípica em *E. erythrinus*, destacando-se diferentes rearranjos cromossômicos como fusões cêntricas e inversões pericêntricas, a origem de cromossomos sexuais múltiplos, a participação de distintas classes de DNAs repetitivos na diferenciação genômica desse grupo, assim como a presença de micro-cromossomos B. A Fig. 1 apresenta uma visão geral do processo de diferenciação e as relações evolutivas propostas para os cariomorfos A-D de *E. erythrinus*. O conjunto dos caracteres cromossômicos já disponíveis corrobora a ocorrência de um complexo de espécies em *E. erythrinus*.

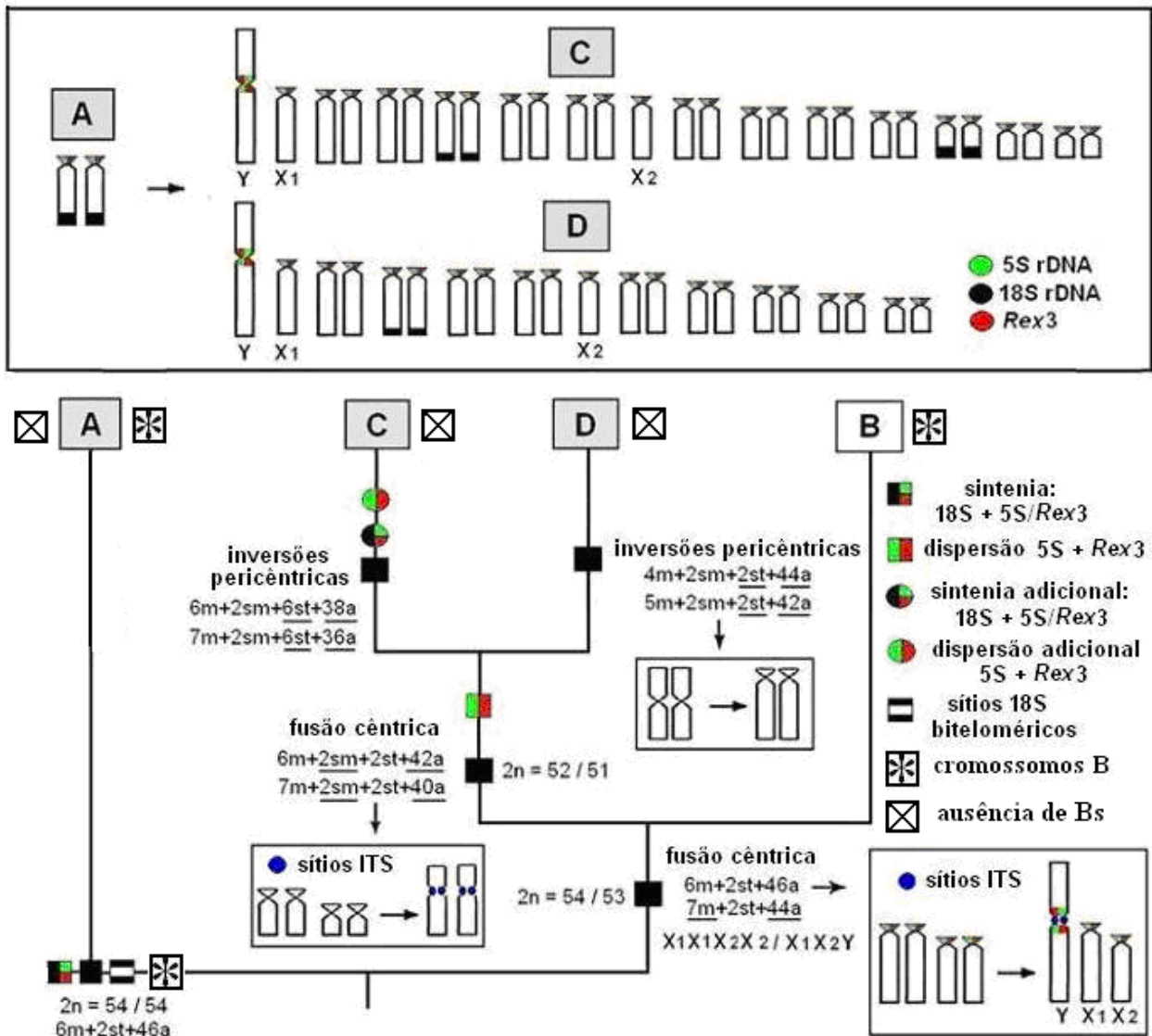


Fig. 1. Diferenciação e relações evolutivas propostas para os cariomorfos A-D de *Erythrinus erythrinus* com base nas suas características cromossômicas gerais e no mapeamento de elementos repetitivos por FISH. As principais mudanças a partir do provável cariótipo basal encontrado no cariomorfo A ($2n=54$; $6m + 2st + 46a$) estão sublinhadas (modificado de Cioffi et al., 2010).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Artoni, R.F., Vicari, M.R., Endler, A.L., Cavallaro, Z.I., Jesus, C.M., Almeida, M.C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica** 127: 277–284.
- Barker, P.E. (1982). Double minutes in human tumor cells. **Cancer Genet Cytogenet** 5: 81–94.
- Bertollo, L.A.C. (2007). Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (eds) **Fish Cytogenetics**, Science Publishers, Enfield, pp. 195-211.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J Genet** 1:103-120.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. (1983). Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia** 48:1-12.
- Bertollo, L.A.C., Fontes, M.S., Fenocchio, A.S., Cano, J. (1997a). The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Res** 5:493–499.
- Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., Fontes, M.S. (1997b). Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with 2n = 40 chromosomes. **Brazil J Genet** 20:237–242.
- 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. **Chromosome Res** 8:603–613.
- Bertollo, L.A.C., Oliveira, C., Molina, W.F., Margarido, V.P., Fontes, M.S., Pastori, M.S., Falcão, J.N., Fenocchio, A.S. (2004). Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity** 93:228–233.
- Biémont, C., Vieira, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. **Nature** 443:521–524.

- Blanco, D.R., Lui, R.L., Vicari, M.R., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2011). Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenet Genome Res** 132:71-78.
- 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** 8:111–118.
- Camacho, J.P.M., Sharbel, T.F., Beukeboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. London** 355: 163–178.
- Carvalho, R.A., Martins-Santos, I.C., Dias, A.L. (2008). B chromosomes: An update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **J Fish Biol** 72: 1907-1932.
- Cavallaro, Z.I., Bertollo, L.A.C., Perfectti, F., Camacho, J.P.M. (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Res** 7: 627–634.
- Charlesworth, B., Snlegowski, P., Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 371:215–220.
- 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** 105: 554-561.
- Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C. (2012). Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, M.A. (ed) **Repetitive DNA - Genome Dynamics**, v. 7, Karger, Basel, pp. 197–221.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertollo, L.A.C. (2009a). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics** 10:34.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U., Bertollo, L.A.C. (2009b). Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. **Cytogenet Genome Res** 125:132-141.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertollo, L.A.C. (2010a). Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*.

- Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evol Biol** 10: 271.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Rebordinos, L., Vicari, M.R., Bertollo, L.A.C. (2010b). Differentiation of the XX/XY sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*: Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sex Dev** 4: 176–185.
- Cioffi, M.B., Sánchez, A., Marchal, J.A., Kosyakova, N., Liehr, T., Trifonov, V., Bertollo, L.A.C. (2011a). Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. **Genetica** 139:1065–1072.
- 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. **BMC Evol Biol** 11:186.
- Cioffi, M.B., Molina, W.F., Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C. (2012a). Chromosomes as tools for discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family. In: Padma Tirunilai (ed) **Recent Trends in Cytogenetic Studies-Methodologies and Applications**, 1st edn, InTech, Rijeka, pp. 125–146.
- Cioffi, M.B., Kejnovsky, E., Marquioni, V., Poltronieri, J., Molina, W.F., Diniz, D., Bertollo, L.A.C. (2012b). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **BMC Mol Cytogenet** 5:28.
- Dergam, J.A., Bertollo, L.A.C. (1990). Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **J Genet** 13:755–766.
- Dimitri, P., Junakovic, N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. **Trends Genet** 15:123–124.
- Diniz, D., Bertollo, L.A.C. (2003). Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia** 56:303–313.
- Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. (1990). Supernumerary chromosomes in *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genetica** 81: 193-198.

- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zool J Linnean Soc** 72:297-353.
- Foresti, F., Almeida-Toledo, L.F., Toledo, S.A. (1989). Supernumerary chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica** 79: 107–114.
- Giuliano-Caetano, L, Bertollo, L.A.C. (1988). Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the Rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). **Rev Bras Genet** 11(2): 299–306.
- Giuliano-Caetano, L., Jorge, L.C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. (2001). Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia** 66:39–43.
- Grewal, S.I.S., Jia, S. (2007). Complexities of heterochromatin in fungi, ciliates, plants and mammals. **Nat Rev Genet** 8:35–46.
- Horvath, J.E., Bailey, J.A., Locke, D.P., Eichler, E.E. (2001). Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. **Hum Mol Genet** 10:2215–2223.
- Jesus, C.M., Galetti Jr., P.M., Valentini, S.R., Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica** 118: 25–32.
- Jones, R.N., Rees, H. (1982). **B chromosomes**. Academic Press, London.
- Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J. (2005). Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet Genome Res** 110:462–467.
- Kidwell, M.G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica** 115:49–63.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome** 51:350–356.
- Levan A, Fredga, K, Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201–220.

- López-Flores, I., Garrido-Ramos, M.A. (2012). The repetitive DNA content in eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos, M.A. (ed) **Repetitive DNA Genome Dynamics**, v 7, Karger, Basel, pp. 1–28.
- Maistro, E.L., Foresti, F., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F. (1992). Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica** 87:101-106.
- Martins, C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (eds) **Fish Cytogenetics**. Science Publishers, Enfield, pp. 421–453.
- Martins, C., Ferreira, I.A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti Jr, P.M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica** 127:133–141.
- Mestriner, C.A., Galetti Jr., P.M., Valentini, S.R., Ruiz, I.R.G., Abel, L.D.S., Moreira-Filho, O., Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85: 1-9.
- Moreira-Filho, O, Galetti Jr, P.M., Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetraodonterinae): An overview in natural populations. **Cytogenet Gen Res** 106: 230–234.
- Morelli, S., Vicari, M.R., Bertollo, L.A.C. (2007). Evolutionary cytogenetics in species of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Braz J Biol** 67: 897-903.
- Néo, D.M., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2000). Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica** 108: 211–215.
- Noletto, R.B., Vicari, M.R., Cestari, M.M., Artoni, R.F. (2012). Variable chromosomes frequencies between males and females of two species of pufferfishes (Tetraodontiformes). **Rev Fish Biol Fisheries** 22: 343–349.
- Oliveira, C., Saboya, S.M.R., Foresti, F., Senhorini, J.A., Bernardino, G. (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochodus lineatus*. **Heredity** 79: 473-476.

- Oyakawa, O.T. (2003). Family Erythrinidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S., Carl Ferraris, C. (Eds.) **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Ediprucs, Porto Alegre, pp. 238-240.
- 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** 7:117-140.
- Pauls, E., Bertollo, L.A.C. (1983). Evidence for a system of a supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia** 36: 207–314.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83:2934–2938.
- Rosa, R. da, Rubert, M., Martins-Santos, I.C., Giuliano-Caetano, L. (2012). Evolutionary trends in *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Rev Fish Biol Fisheries** 22:467–475.
- Salvador, L.B., Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity** 69: 50–56.
- Shimoda, N., Knapik, E.W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E. et al. (1999). Zebrafish genetic map with 200 microsatellite markers. **Genomics** 58:219–232.
- Tautz, D., Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res** 12:4127–4138.
- Vanzela, A.L.L., Swarça, A.C., Dias, Ruas, P.M., Ruas, C.F., Sbalqueiro, I., Stolf, R., Giuliano Caetano, L. (2002). Differential distribution of (GA)₉ + C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia** 67:9–13.
- Vari, R.P., Castro, R.M.C., Raredon, S.J. (1995). The Neotropical fish family Chilodontidae (Teleostei: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of *Centropus* Günther. **Smiths Contrib Zool** 577:1-32.
- 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. **Genet Mol Biol** 28:103–110.
- Vicari, M.R., Pistune, H.F.M., Castro, J.P., Almeida, M.C., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., Camacho, J.P.M., Artoni, R.F. (2011). New insights on the origin of B

- chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica** 139: 1073–1081.
- Vicente, V.E., Moreira-Filho, O., Camacho, J.P.M. (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet** 74:70-75.
- Voltolin, T. A., Senhorini, J.A., Foresti, F., Bortolozzi, J., Porto-Foresti, F. (2011). Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genet Mol Biol** 34: 220-224.
- Yoshida, K., Terai, Y., Mizoiri, S., Aibara, M., Nishihara, H., Masakatsu, W., Kuroiwa, A., Hirai, H., Hirai, Y., Matsuda, Y., Okada, N. (2011). B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PLoS Genet** 7(8): e1002203.