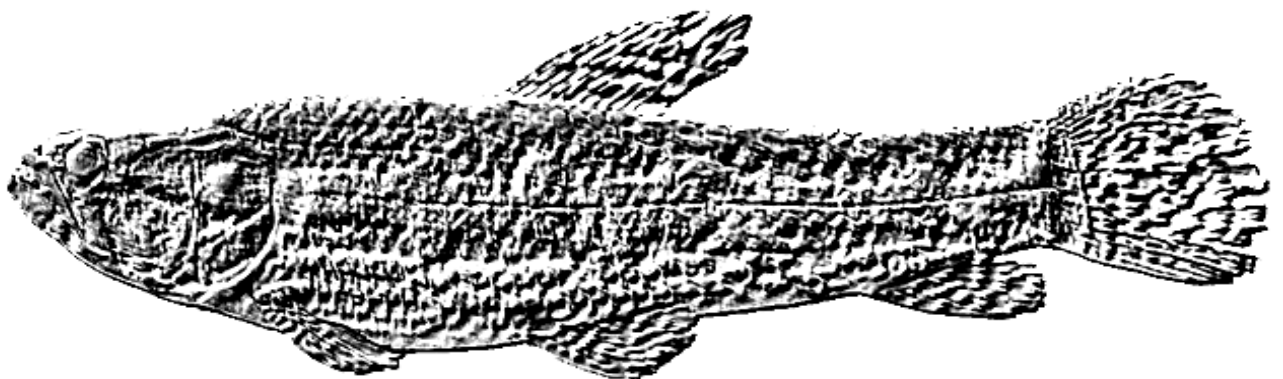




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES  
ALOPÁTRICAS DO GÊNERO *HOPLIAS* (CHARACIFORMES,  
ERYTHRINIDAE), COM ENFOQUE NOS GRUPOS  
*MALABARICUS* E *LACERDAE*.**



**Daniel Rodrigues Blanco**

São Carlos  
2010

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES  
ALOPÁTRICAS DO GÊNERO *HOPLIAS* (CHARACIFORMES,  
ERYTHRINIDAE), COM ENFOQUE NOS GRUPOS  
*MALABARICUS* E *LACERDAE*.**

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES  
ALOPÁTRICAS DO GÊNERO *HOPLIAS* (CHARACIFORMES,  
ERYTHRINIDAE), COM ENFOQUE NOS GRUPOS *MALABARICUS*  
E *LACERDAE*.**

**DANIEL RODRIGUES BLANCO**

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

SÃO CARLOS

2010

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

B641cc

Blanco, Daniel Rodrigues.

Caracterização citogenética de populações alopátricas do gênero *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae), com enfoque nos grupos *malabaricus* e *lacerdae* / Daniel Rodrigues Blanco. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Citogenética de peixes. 2. Marcadores genéticos. 3. *Hoplias malabaricus*. 4. *Hoplias lacerdae*. 5. Transposição de águas - Piumhi, Rio. I. Título.

CDD: 597.087322 (20<sup>a</sup>)

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

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE POPULAÇÕES  
ALOPÁTRICAS DO GÊNERO HOPLIAS  
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE), COM ENFOQUE  
NOS GRUPOS MALABARICUS E LACERDAE.**

Dissertação de Mestrado de Daniel Rodrigues Blanco

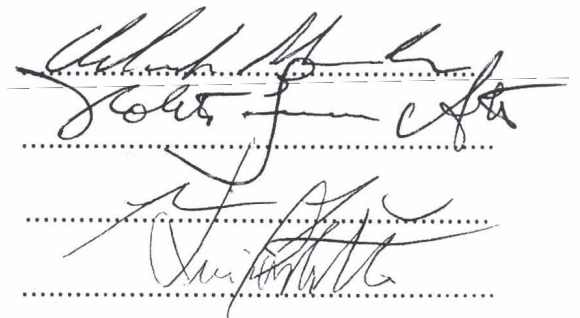
Banca Examinadora

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo



Handwritten signatures of the examiners, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in black ink on a white background with horizontal dotted lines.

Dedico este trabalho aos meus pais Reinaldo

Jesus Blanco e Maria de Lourdes Rodrigues

Blanco pelo amor, apoio e confiança

"A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,  
mas aquilo em que ele nos transforma."

(John Ruskin)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que tenho em minha vida.

Gostaria de expressar meus agradecimentos aos meus pais: Reinaldo Jesus Blanco e Maria de Lourdes Rodrigues Blanco, por todo amor, carinho, dedicação, compartilhando desde momentos de alegria até de extrema angústia. Obrigado por tudo. Amo vocês !!!

Ao meu “Pai Científico”, Amigo e Orientador, Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, obrigado por toda dedicação, pela excelente orientação, por todas oportunidades e por sempre acreditar que seria possível! Valeu Chefe!!

Ao professor Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, meu Co-Orientador e amigo, obrigado pelas considerações, pela amizade e pela oportunidade de convívio.

Ao professor Dr. Pedro Galetti Jr. Pelos poucos momentos, porém de fundamental importância.

Gostaria de agradecer aos amigos de laboratório: Josi (Cléia), Juliana (July), Prequexé (Beto), Marcelinho (boyfish) e Eli, obrigado pela amizade, pelos momentos de ajuda, descontração e pelo empenho em formar um grupo de citogenética.

Aos técnicos de laboratório e coleta Pedro Gallo (Galinácio) e Luiz Henrique (Piau), obrigado por não medir esforços nas coletas e pela amizade que se fortalece a cada dia.

Aos colegas da Pós e departamento, obrigado pelos momentos juntos, pelas rizadas e pelas cervejinhas.

Ao Jorjão pela amizade, pelos cafés e por me fazer rir todas as vezes que dizia que acreditava que o Corinthians seria campeão da libertadores !!!

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a toda a estrutura institucional e humana que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo e à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 07/57301-1), que muito auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Brasileiro de meio Ambiente – IBAMA – e ao Instituto Estadual de Floresta – IEF, pela autorização e apoio na coleta dos exemplares.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.



## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANIEL RODRIGUES BLANCO** – Nascido em 4 de Novembro de 1981, na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Iniciou sua graduação na Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Rio Claro e após dois anos concluídos transferiu-se para o curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, graduando-se em dezembro de 2007. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC em 2005 e, posteriormente, bolsista FAPESP em 2006 e 2007. Atuou como monitor na Disciplina de Citogenética Básica e Molecular de 2005 a 2009. Durante este período, participou de projetos de pesquisa, relacionados à citogenética de peixes, desenvolvidos sobre a coordenação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e do Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo. Co-orientou uma Iniciação Científica em 2008, além de participar de uma banca de Monografia, neste mesmo ano. Durante a execução desse trabalho, foi bolsista de Mestrado da FAPESP.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1. Citogenética de Peixes.....	1
1.2. Gênero <i>Hoplias</i> .....	2
1.3. Grupo <i>Hoplias malabaricus</i> .....	3
1.4. Grupo <i>Hoplias lacerdae</i> .....	3
1.5. A bacia do rio Paraná .....	4
1.6. Bacia do rio São Francisco.....	5
1.7. Bacia do Araguaia/Tocantins .....	6
1.8. Bacia do rio Xingu (Bacia Amazônica) .....	7
1.9. Consequências de alterações geomorfológicas em populações alopátricas .....	7
1.10. A transposição do rio Piumhi (MG).....	9
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1. Material e Locais de Coleta.....	14
4.2. Metodologia .....	18
4.2.1. Obtenção de mitoses por tratamento “ <i>in vivo</i> ” .....	18
4.2.2. Obtenção de mitoses por tratamento “ <i>in vitro</i> ” .....	19
4.2.3. Indução do aumento do número de mitoses: suspensão de leveduras.....	20
4.2.4. Classificação cromossômica .....	20
4.2.5. Bandamento C .....	21
4.2.6. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs).....	21
4.2.7. Análises seqüenciais.....	22
4.2.8. Coloração pelo fluorocromo G-C específico, Cromomicina A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) .....	22
4.2.9. Extração de DNA com tampão salino .....	22
4.2.10. Prospecção de DNA repetitivo via cinética de re-associação .....	23
4.2.11. Clonagem .....	23
4.2.12. Seleção de clones de interesse.....	24
4.2.13. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	25
4.2.14. Análises cariotípicas.....	26
<b>5. REFERÊNCIAS (Introdução, Materiais e Métodos).....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>33</b>
Resumo .....	34
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	36
Resultados .....	37
Discussão.....	40
Referências .....	45
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>54</b>
Resumo .....	55
Introdução.....	55
Material e Métodos.....	57

Resultados .....	59
Discussão.....	61
Referências Bibliográficas .....	65
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>76</b>
Resumo.....	77
Introdução.....	77
Materiais e Métodos.....	79
Resultados .....	80
Discussão.....	81
Referências Bibliográficas .....	86
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

### MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Exemplar do grupo *Hoplias malabaricus* medindo 27 cm ----- 15
- Figura 2.** Exemplar de *Hoplias aimara* medindo 76 cm ----- 15
- Figura 3.** Exemplar de *Hoplias intermedius* medindo 42 cm ----- 15
- Figura 4.** Mapa das regiões de coleta na bacia do Alto Paraná e do São Francisco. (a) Estado de Minas Gerais, mostrando o rio Grande e o rio São Francisco. (b) Localidades de coleta em ambas as bacias, com ênfase na região de transposição do rio Piumhi (Blanco *et al.*, 2009). Os círculos vermelhos indicam os pontos de coleta.----- 16
- Figura 5.** Mapa com os pontos de coleta na bacia do rio Araguaia e do rio Xingu (bacia Amazônica). Os pontos 1, 2 e 3 referem-se aos afluentes do rio Araguaia e o 4 refere-se às lagoas marginais do rio Sete de Setembro ----- 17

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Localização dos pontos de coleta. (a) Estado de Minas Gerais, (b) Região de transposição do Rio Piumhi. ----- 50
- Figura 2.** Cariótipos dos exemplares analisados. (a) Giemsa. (b) Bandamento C. (c) Coloração com CMA3. (d) Ag-NOR. (e) Sítios de rDNA 18S. (f) Sítio de rDNA 5S. Barra = 5 µm. ----- 51
- Figura 3.** Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNA satélite 5SHindIII. Barra = 5 µm. ----- 52
- Figura 4.** Idiograma comparativo dos dois cariomorfos de *Hoplias malabaricus* e exemplar de *Hoplias intermedius*, indicando todos os marcadores utilizados. Preto = heterocromatina C-positiva, azul = sítios de rDNA 5S, vermelho = sítios de rDNA 18S, amarelo = sítios do DNA satélite 5SHindIII e verde = Cromomicina A<sub>3</sub> positiva. ----- 52

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo A) com coloração Giemsa convencional (a, d, g), com bandamento C (b, e, h) das populações das bacias do rio São Francisco (a, b), Araguaia (d, e) e Xingu (g, h). Nos boxes estão apresentados os cromossomos portadores de Ag-NORs nas populações do São Francisco (c), Araguaia (f) e Xingu (i). Barra = 5 µm. ----- 71

**Figura 2.** Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo A) com hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 5S (a, d, g), rDNA 18S (b, e, h) e DNA satélite 5SHindIII (c, f, i) das populações das bacias dos rios São Francisco (a, b, c), Araguaia (d, e, f) e Xingu (g, h, i). Barra = 5 µm. ----- **72**

**Figura 3.** Idiogramas referente às populações de *H. malabaricus* das bacias dos rios São Francisco (a), Araguaia (b) e Xingu (c), destacando os marcadores cromossômicos obtidos. Preto = heterocromatina C-positiva, azul = sítios de rDNA 5S, vermelho = sítios de rDNA 18S e amarelo = sítios do DNA satélite 5SHindIII. ----- **73**

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Obtenção do DNA Cot-1 de *H. aimara* e *H. intermedius*. (M) Marcador *Low mass*; (1) DNA genômico de *H. intermedius* e (2) de *H. aimara*. (3); DNA genômico de *H. intermedius* (3) e de *H. aimara* (4) após serem autoclavados por 5 minutos; (5) DNA Cot-1 de *H. intermedius* e (6) de *H. aimara*. ----- **91**

**Figura 2.** Cariótipos das espécies analisadas. (a) Coloração convencional por Giemsa, (b) Bandamento C e Ag-NOR in Box. Barra = 5 µm. ----- **92**

**Figura 3.** Metáfases de *H. aimara* (a, b) e *H. intermediu* (c, d). Coloração com fluorocromo DAPI (a, c) e CMA<sub>3</sub> (b, d). As setas indicam sítios CG ricos em (b) e (d), confirmados negativamente em (a) e (c). ----- **93**

**Figura 4.** Cariótipo de *Hoplias intermedius* e *Hoplias aimara* após hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Barra = 5 µm. ----- **93**

**Figura 5.** Cariótipo de *Hoplias intermedius* e *Hoplias aimara* após hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNA Cot-1 *intermedius* (sinal verde) e DNA Cot-1 *aimara* (sinal vermelho). Os sinais amarelos correspondem a regiões que apresentam sobreposição das duas frações repetitivas pares 1, 3, 4, 9 e 10). Barra = 5 µm. ----- **94**

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Características cromossômicas dos cariomorfos de *Hoplias malabaricus*, de acordo com Bertollo *et al.*

(2000). ----- 53

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Dados citogenéticos referentes a populações do cariomorfo A de *Hoplias malabaricus*. AM = Estado do Amazonas, MT = Estado do Mato-Grosso, GO = Estado de Goiás, MG = Estado de Minas Gerais, SP = Estado de São Paulo, SC = Estado de Santa Catarina, RS = Estado do Rio Grande do Sul, PR = Estado do Paraná, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico. ----- 74

## RESUMO

Erythrinidae representa uma família relativamente pequena de peixes Neotropicais, apresentando uma grande distribuição geográfica. Essa família é composta por apenas três gêneros, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. O gênero *Hoplias* é o mais difundido no continente Sul-Americano e, para a região Sudeste do Brasil, são citados dois grandes grupos, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae*, que apresentam diferenças cariotípicas marcantes no número diplóide e na morfologia dos cromossomos. O grupo *H. malabaricus* deve tratar-se, na realidade, de um “complexo de espécies”, considerando sua conspícua diversidade cariotípica, com sete cariomorfos claramente diferenciados quanto ao número diplóide, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais. No que se refere ao grupo *H. lacerdae*, embora sua macroestrutura cariotípica seja mais estável, uma recente revisão possibilitou identificar seis espécies distintas, pertencentes à diferentes bacias hidrográficas do Brasil. No presente trabalho foram analisados espécimes do grupo *H. malabaricus* das bacias do Alto Paraná, São Francisco, Xingu e Araguaia/Tocantins e espécimes do grupo *H. lacerdae*, representados por *H. intermedius* (bacias dos rios São Francisco e Alto Paraná) e por *H. aimara*, provenientes da região do rio Arinos (bacia Amazônica). Com relação aos exemplares do grupo *H. malabaricus*, dois cariomorfos foram claramente identificados: cariomorfo A, com  $2n=42$  cromossomos meta-submetacêntricos, sem diferenciação entre os sexos (presente na bacia do rio São Francisco – na região de transposição do rio Piumhi - MG, bacia Araguaia/Tocantins - GO e bacia do rio Xingu - MT) e cariomorfo F, com  $2n=40$  cromossomos meta-submetacêntricos, igualmente sem distinção entre os sexos (presente na bacia do rio São Francisco, na região de Três Marias - MG). Na região de transposição do rio Piumhi, o cariomorfo A pode representar uma forma invasora da bacia do rio São Francisco a partir da bacia do Alto Paraná, onde esta forma é mais abundante, visto que para a bacia do São Francisco o cariomorfo F é considerado predominante. Variações cromossômicas inter-populacionais foram detectadas entre as

populações do cariomorfo A das bacias dos rios São Francisco, Araguaia/Tocantins e Xingu, com base em alguns marcadores utilizados. Tais diferenças possivelmente são decorrentes do isolamento entre tais populações, possibilitando a fixação de eventos evolutivos distintos. Por sua vez, as duas espécies (*H. intermedius* e *H. aimara*) representativas do grupo *H. lacerdae* apresentaram uma conservação na macroestrutura cariotípica, com  $2n=50$  cromossomos metassubmetacêntricos, sem cromossomos sexuais diferenciados. Quanto aos exemplares de *H. intermedius*, não foram identificadas diferenças citogenéticas entre os espécimes provenientes das bacias dos rios São Francisco e Alto Paraná. Assim sendo, é possível que conexões naturais tenham possibilitado a dispersão dessa espécie entre tais bacias. Entretanto, análises da fração repetitiva do genoma mostraram diferenças cromossômicas relevantes entre *H. intermedius* e *H. Aimara*, as quais corroboram sua separação em espécies distintas, além de possibilitar a inferência de que, para essa fração do genoma, *H. aimara* poderia ser mais derivada do que *H. intermedius*. Desta forma, os marcadores citogenéticos clássicos e moleculares utilizados no presente trabalho foram excelentes ferramentas para a diferenciação de espécies de *Hoplias*, assim como para a identificação da variação citogenética presente nos grupos *malabaricus* e *lacerdae*, possibilitando um melhor esclarecimento sobre a evolução cariotípica desse gênero.



## ABSTRACT

Erythrinidae represents a relatively small family of Neotropical fish, presenting a great geographical distribution. It is composed only by three genera, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* and *Erythrinus*. The genus *Hoplias* is most widespread in the South American continent. Two great groups, *H. malabaricus* and *H. lacerdae* are described for the Southeast Brazil, showing large karyotypic differences concerning chromosomes' number and morphology. In fact, the *H. malabaricus* group should be treated as a "species complex", considering its great karyotypic diversity, with seven karyomorphs clearly differentiated, including distinct sex chromosome systems. On the other hand, *H. lacerdae* group shows a relatively conserved karyotypic macrostructure. A recent revision of this group identified six different species, belonging to different Brazilian hydrographic basins. In the present work specimens of the *H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups were investigated. The samples of *H. malabaricus* were from the Upper Paraná, São Francisco, Xingu and Araguaia/Tocantins basins. Concerning the *H. lacerdae* group, samples of *H. intermedius* from São Francisco River and Upper Paraná River basins and of *H. aimara* from the Arinos River (Amazonian basin) were analyzed. Two karyomorphs were clearly identified in the *H. malabaricus* group: karyomorph A, with  $2n=42$  meta- and submetacentric chromosomes and without sex-related differences and karyomorph F, with  $2n=40$  meta- and submetacentric chromosomes, also without distinction between the sexes. In the transposition region of the Piumhi River (São Francisco River basin), the karyomorph A may represent an invading form from the Upper Paraná River basin, where it is more abundant. In the São Francisco River basin the karyomorph F is considered predominant. Chromosomal variations were detected among the populations of the karyomorph A analyzed, on the base of distinct cytogenetic markers, probably due to geographic isolation of such populations, making possible the fixation of different evolutionary events. On the other hand, *H. intermedius* and *H. aimara* presented a conserved karyotypic macrostructure, with  $2n=50$  meta- and submetacentric

chromosomes, without a sex chromosome system. As for the specimens of *H. intermedius*, no cytogenetic differences were detected among the São Francisco and Upper Paraná River populations, where natural connections have made possible the dispersion of that species between such basins. However, analyses of the repetitive fraction of the genome showed relevant chromosome differences between *H. intermedius* and *H. aimara*, which corroborate with their separation in different species. It could also be inferred that, at least for this fraction of the genome, *H. aimara* can be considered more derivative than *H. intermedius*. This way, the classic and molecular cytogenetic markers used in the present work were excellent tools for the differentiation of *Hoplias* species, as well as for the identification of the present genetic variation in the *H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups, making possible a better explanation on their karyotypic evolution.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Citogenética de Peixes

A citogenética teve início na década de 70 e hoje reúne um dos maiores grupos de pesquisadores voltados a um campo de interesse comum, com diversos laboratórios de pesquisa distribuídos entre diferentes estados brasileiros, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul, alguns já mais antigos e bem consolidados, ao lado de outros mais recentes e em fase de consolidação.

O aperfeiçoamento progressivo de várias metodologias de estudo contribuiu para o avanço dessa área. Ao lado das técnicas mais tradicionais de análises (coloração convencional por Giemsa, Ag-RONs e bandamento C), outras metodologias propiciando bandamentos cromossômicos mais resolutivos (bandamento G, incorporação de análogos de bases, enzimas de restrição), além do emprego de fluorocromos base-específicos, análise de complexos sinaptonêmicos, hibridação fluorescente “in situ” com sondas de rDNA 18S e 5S e de DNA satélite, tem proporcionado a obtenção de resultados bastante positivos (Almeda-Toledo, 1998), comparáveis a aqueles que vem sendo obtidos em bons centros de estudo do exterior.

Estudos citogenéticos têm se mostrado decisivo para o conhecimento e entendimento da diversidade ictiofaunística encontrada na região Neotropical. Atualmente são conhecidas cerca de 6.000 espécies de peixes para essa região (Vari & Malabarba, 1998), correspondendo a 25% da biodiversidade mundial. A América do Sul abriga a maior parte dessa biodiversidade nas bacias Amazônica e do Paraná, a primeira com cerca de 3.500 espécies de peixes (Santos & Ferreira, 1999) e a segunda com aproximadamente 600 espécies (Bonetto, 1986)

A ordem Characiformes é uma das mais representativas na ictiofauna da região Neotropical onde é possível distinguir, citogeneticamente, dois grupos gerais de peixes: uma com macroestrutura cariotípica constante e outro com um padrão cromossômico mais

heterogênico, caracterizando por variações cromossômicas tanto numéricas quanto estruturais (Galetti Jr. *et al.*, 1994).

## 1.2. Gênero *Hoplias*

Dentre as diversas famílias de peixes Neotropicais de água doce, a família Erythrinidae, embora relativamente pequena, destaca-se por sua grande abrangência biogeográfica, estando presente nas quatro grandes bacias fluviais brasileiras - Bacia Amazônica, do Paraná, do São Francisco e do Leste (Bertollo, 1978). Essa família engloba os peixes popularmente conhecidos como traíras, traíróes, jejus, etc. Este grupo apresenta exemplares com datação geológica bastante antiga. Gayet *et al.* (2003), encontraram restos de um fóssil brasileiro pertencente ao Mio-Plioceno, nas proximidades do rio Branco, no Estado do Acre, o qual foi inserido em um novo gênero, +*Paleohoplias assisbrasiliensis*.

Azevedo & Gomes (1943) consideraram três gêneros em Erythrinidae: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. Embora os três gêneros tenham uma distribuição bastante ampla no continente Sul-Americano, o gênero *Hoplias* é o mais difundido. Para a região Sudeste são identificados dois grupos, *H. malabaricus* e *H. lacerdae*, conhecidos popularmente como traíras e traíróes, respectivamente. Uma diferença morfológica marcante entre os dois grupos encontra-se na região gular, uma vez que as bordas dos dentários são convergentes em *H. malabaricus*, encontrando-se na região anterior, mas sendo paralelas em *H. lacerdae*. Citogeneticamente, os grupos *H. lacerdae* e *H. malabaricus* apresentam diferenças marcantes tanto ao número diplóide (*H. malabaricus* variando de  $2n = 39$  a  $2n = 42$  e *H. lacerdae* com  $2n = 50$ ) e morfologia dos cromossomos.

### **1.3. Grupo *Hoplias malabaricus***

*H. malabaricus* é um dos grupos de peixes Neotropicais que vem sendo bastante estudado do ponto de vista citogenético, desde os estudos iniciais de Bertollo (1978). Distintas populações já foram analisadas, abrangendo diferentes regiões da América do Sul, desde a Argentina até o Suriname, incluindo uma variedade de estados brasileiros (Bertollo *et al.*, 2000).

Segundo Bertollo *et al.* (2000) *H. malabaricus*, trata-se na realidade de um conjunto de espécies que apresenta uma conspícua diversidade cariotípica. Sete cariomorfos são claramente identificados com base no número diplóide, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais. Enquanto alguns cariomorfos mostram uma ampla distribuição geográfica, alguns se apresentam como endêmicos em determinadas bacias podendo, inclusive, ocorrer cariomorfos simpátricos sem detecção de formas híbridas.

Considerando tais particularidades, os cariomorfos podem ser reunidos em dois grandes grupos: Grupo I (cariomorfos A, B, C e D) e Grupo II (cariomorfos E, F e G), onde as estruturas cariotípicas gerais, os sistemas de cromossomos sexuais, assim como a ocorrência de cromossomos atípicos mostram-se mais indicativos para o estabelecimento de relações evolutivas entre os cariomorfos do que as similaridades no número diplóide (Bertollo *et al.*, 2000).

Em todos os estudos realizados até o presente momento, nenhuma forma híbrida entre estes citotipos foi encontrada, embora possam ocorrer regiões de simpatria entre eles. Até o momento, ainda não foram diagnosticados caracteres morfológicos concisos para a diferenciação das prováveis espécies agrupadas em *H. malabaricus*.

### **1.4. Grupo *Hoplias lacerdae***

Oyakawa & Mattox. (2009) reconheceram seis espécies válidas no grupo *H. lacerdae*, ou seja, *H. lacerdae*, *H. brasiliensis*, *H. aimara*, *H. curupira*, *H. intermedius* e *H. australis*.

Os representantes desse grupo que já foram estudados citogeneticamente apresentaram características cariotípicas conservadas quando comparada com espécimes do grupo *H. malabaricus*, com um número diplóide igual a 50 cromossomos, sem a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais diferenciado. Bertollo *et al.* (1978), propuseram um sistema XX/XY para uma população coletada em ambiente de cultivo o qual, entretanto, necessitaria de confirmação à luz de novas metodologias de estudo.

Morelli *et al.* (2007) ampliou o conhecimento citogenético do grupo *H. lacerdae* ao estudarem exemplares de duas distintas populações naturais: uma do rio São Francisco (Três Marias – MG) e a outra de Pitinga (AM), além de espécimes provenientes de duas estações de piscicultura pertencentes à Universidade Federal de Uberlândia e à UNESP (campus Jaboticabal – SP). Nesse estudo não foram encontradas diferenças cariotípicas significativas entre as populações analisadas, todos os exemplares apresentando  $2n = 50$  cromossomos meta-submetacêntricos e sem sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, evidenciando a relativa homogeneidade cariotípica do grupo *H. lacerdae* quando comparado com o grupo *H. malabaricus*.

O desenvolvimento experimentado pela citogenética ao longo dos últimos anos, auxiliado pela Biologia Molecular, vem se caracterizando como uma ferramenta eficaz na compreensão de grupos taxonomicamente não resolvidos e na caracterização da sua diversidade.

### **1.5. A bacia do rio Paraná**

A bacia do Prata, que é formada principalmente pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, drena uma região de aproximadamente 3,2 milhões de km<sup>2</sup> na América do Sul, atravessando quatro países: Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Caracteriza-se por ser a segunda maior bacia Sul-Americana, perdendo somente para a bacia Amazônica. A bacia do Prata ocupa 10,5% do território brasileiro percorrendo dois Estados da região Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato

Grosso do Sul), dois da região Sudeste (São Paulo, Minas Gerais) e todos os Estados da região Sul (IBAMA, 2009a).

O rio Paraná é o principal componente da bacia do Prata e o décimo maior do mundo em vazão de água (IBAMA, 2009a). Como segundo maior rio da América do Sul, percorre aproximadamente 4.695 km desde sua nascente na Serra da Mata da Corda (MG) até o rio da Prata, dos quais 3.809 km dentro do território brasileiro, drenando uma região de 891.000 km<sup>2</sup> (Agostinho & Júlio Jr., 1999; IBAMA, 2009a).

No Brasil, o rio Paraná é dividido em duas regiões: o Alto Paraná, que vai desde sua nascente até a usina de Itaipu; e o Baixo Paraná, que corresponde a região posterior a essa barragem (Agostinho *et al.*, 2004).

A ictiofauna da bacia do rio Paraná em seu trecho brasileiro é composta por aproximadamente 250 espécies, distribuídas em diversas ordens, entre elas, Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Rajiformes, Cypriniformes, Pleuronectiformes, Clupeiformes, Cyprinodontiformes e Symbranchiformes (Agostinho & Júlio Jr., 1999).

## **1.6. Bacia do rio São Francisco**

A bacia do rio São Francisco é a terceira maior entre as bacias brasileiras, drenando uma área de 640.000 km<sup>2</sup>, correspondendo a cerca de 8% do território nacional (IBAMA, 2009c). Abrange as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, passando pelos Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (Paiva, 1982). O rio São Francisco, caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cascatas, inicia seu curso no Planalto de Araxá, nas nascentes do rio Samburá, e sua foz está localizada no oceano Atlântico, entre os Estados de Sergipe e Alagoas. Entre a cabeceira e sua foz apresenta a extensão de aproximadamente 2.863 km (Silva *et al.*, 2003).

Apresenta-se dividido em quatro regiões: Alto São Francisco, que vai das nascentes até Pirapora-MG; Médio São Francisco, de Pirapora até Remanso-BA; Sub-Médio São Francisco, que vai deste último até a cachoeira de Paulo Afonso e o Baixo São Francisco, que vai desde esta cachoeira até sua foz (Sato & Godinho, 1999; IBAMA, 2009c). Segundo IBAMA (2009c), o rio São Francisco possui 36 tributários de porte significativo, dos quais apenas 19 são perenes.

Grande parte de sua ictiofauna concentra-se em seus afluentes permanentes e de água com pouco material em suspensão, sendo que cerca de 150 espécies nativas de peixes já foram identificadas (Sato & Godinho, 1999; IBAMA, 2009c). De acordo com IBAMA (2009c), vale ressaltar que muitas espécies de outras bacias, ou mesmo espécies exóticas, já foram introduzidas na bacia do São Francisco, quando do povoamento de seus reservatório e açudes.

### **1.7. Bacia do Araguaia/Tocantins**

A bacia Araguaia/Tocantins drena uma área de 918.822 km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 11% do território nacional. É a maior bacia situada inteiramente em território brasileiro e a segunda maior em termos de área, sendo inferior apenas à bacia Amazônica, que possui 3.869.953 km<sup>2</sup> (ANA, 2009). Da área total de drenagem, 379.935 km<sup>2</sup> correspondem à bacia do rio Tocantins, 385.060 km<sup>2</sup> à bacia do rio Araguaia, além das bacias dos rios Pará e Pacajá (62.899 km<sup>2</sup>) e das bacias dos rios Acará e Guamá (90.928 km<sup>2</sup>).

O rio Araguaia possui sua nascente no limite sul da divisa entre os Estados de Mato Grosso e Goiás, em uma altitude de 850 metros. Segundo Innocencio (1989), o rio Araguaia percorre aproximadamente 2115 km, sendo considerado um rio de planície. Suas águas são relativamente calmas, diferentemente das águas do rio Tocantins, que é o seu principal afluente e caracteriza-se pela presença de corredeiras e cachoeiras ao longo de seu curso, antes da confluência.



Aproximadamente 300 espécies de peixes já foram identificadas na bacia do Araguaia/Tocantins. Há ocorrência de muitas espécies endêmicas, principalmente no seu curso superior. De maneira geral, a diversidade e abundância de peixes nessa bacia diminuem da foz em direção das cabeceiras, o que se relaciona principalmente à ausência de áreas de inundação (IBAMA, 2009b).

### **1.8. Bacia do rio Xingu (Bacia Amazônica)**

A bacia Amazônica é a maior bacia hidrográfica do mundo, com 7.050.000 km<sup>2</sup>, sendo que 3.904.392,8 km<sup>2</sup> estão em terras brasileiras. Está localizada em uma região de planície e tem cerca de 23 mil km de rios navegáveis, que possibilitam o desenvolvimento do transporte hidroviário. A navegação é importante nos grandes afluentes do rio Amazonas, como o Madeira, o Xingu, o Tapajós, o Negro, o Trombetas e o Jari (ANA, 2009).

O Xingu, que possui cerca de 1.815 K de extensão, nasce no Estado de Mato Grosso, pelo encontro das águas do rio Kuluene e Sete de Setembro, seguindo posteriormente pelo Estado do Pará e desembocando na margem direita do rio Amazonas.

Apresenta-se muito largo, quase em forma de estuário, estreitando-se somente na sua foz, onde tem cerca de 7 km de largura. A influência da maré se faz sentir em praticamente todo o trecho desse rio. Nas proximidades da foz, assim como a montante da vila de Souzel, encontram-se numerosas ilhas, geralmente baixas e alagadiças, algumas delas aproveitadas para fins agrícolas ou como pastagens. (ANA, 2009).

### **1.9. Consequências de alterações geomorfológicas em populações alopátricas**

Vários estudos cariotípicos vêm demonstrando que em muitas espécies dos gêneros *Astyanax* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), *Hoplias* (Bertollo *et al*, 2000), *Characidium*

(Centofante *et al.*, 2001, 2003), entre outros, o isolamento geográfico possivelmente tenha contribuído para a diversidade cromossômica encontrada nestes peixes, caracterizando assim uma evolução cromossômica alopátrica. É sabido que alterações geomorfológicas podem promover a incorporação de um curso d'água de uma bacia para outra bacia adjacente (captura de cabeceiras), conforme postulado por Ab`Saber (1954), para explicar a origem do rio Paraíba do Sul, na região do Estado de São Paulo. Assim, o evento de captura de cabeceira pode colocar em contato diferentes espécies que evoluíram alopatricamente, como parece ser o caso em *Characidium* (Centofante *et al.*, 2003). O mesmo poderia ocorrer em regiões alagadas, quando a cabeceira de um afluente entra em contato com a cabeceira de um tributário de outra bacia hidrográfica, fato este conhecido como “águas emendadas”, o que pode ser observado no Planalto Central Brasileiro, nas imediações de Brasília, bem como no canal de Cassiquiare, que conecta os rios Orenoco e Negro, na bacia Amazônica. Assim, esses eventos naturais de conexões entre diferentes bacias hidrográficas poderiam se transformar em rotas migratórias para formas de peixes generalizadas.

Entretanto, conexões artificiais devidas a ações antropológicas podem também levar à mistura de ictiofaunas, como o complexo de aproveitamento hidroelétrico envolvendo os rios Paraíba do Sul, Pirai e o ribeirão das Lajes, construído no final do século XIX-começo do século XX, com a finalidade de levar água potável e energia elétrica para o Estado do Rio de Janeiro. Nesse caso a água do rio Paraíba do Sul é bombeada através de tubulações para os rios Pirai e ribeirão das Lajes, que pertencem a bacias diferentes.

A quebra de barreiras naturais tem como uma de suas principais conseqüências o estabelecimento de condições de simpatria. Populações alopátricas podem, em decorrência de um distúrbio biogeográfico, tornar-se simpátricas com a possível formação de híbridos. Assim, por exemplo, a simpatria entre os citótipos A, C e D de *H. malabaricus* foi observada na bacia do

Alto Paraná, em decorrência da construção da barragem de Itaipu, embora sem a detecção de formas híbridas (Pazza & Júlio Jr., 2003).

Dentre todos esses eventos de conexões artificiais entre bacias hidrográficas distintas, o caso do rio Piumhi é um dos mais notáveis. A transposição do rio Piumhi (bacia do rio Grande – Alto Paraná), para a bacia do rio São Francisco, foi realizada há mais de 43 anos. No entanto, este evento ficou sem o conhecimento adequado da comunidade científica durante todo esse tempo, com a conseqüente ausência de informações sobre o seu impacto. De uma forma geral, desconhe-se os efeitos da transposição de rios sobre as ictiofaunas brasileiras.

#### **1.10. A transposição do rio Piumhi (MG)**

Segundo Moreira-Filho & Buckup (2005), a cabeceira do rio Piumhi está localizada na divisa entre municípios de Vargem Bonita e Piumhi, no centro-oeste do Estado de Minas Gerais. Sua cabeceira é formada pela junção dos córregos Destêrro, Jorça e Confusão, aproximadamente a 930 metros de altitude.

No final dos anos 50, as águas do rio Piumhi dirigiam-se por um pequeno trecho para o Nordeste, deslocando-se posteriormente para o Leste, em seguida para o Sudeste e finalmente para o Sul, passando a ser esta a sua direção geral até a foz. Em parte de seu percurso, o rio Piumhi atravessava uma região de planície alagada com mais de 38 km de extensão, denominada antigamente como o pantanal do rio Piumhi. À margem esquerda desse rio encontra-se a cidade de Capitólio, de onde as águas do Piumhi continuavam rumando ao Sul, até sua foz, na margem direita do rio Grande. Portanto, até 1963, o rio Piumhi pertencia à bacia do rio Grande.

Segundo as folhas cartográficas de Vargem Bonita, rio Piumhi, Piumhi e Capitólio (escala 1.50.000), os principais afluentes do rio Piumhi, à margem direita, são córregos da Jorça, da Confusão e da Estiva, ribeirão dos Pavões, córregos dos Bois, da Onça, do Servo, Campão Grande, do Fumo, Mutuca, Penedo, ribeirão da Cachoeira e córregos Água Limpa, dos Soares e

Araujo. Os afluentes da margem esquerda são os córregos do Destêrro, das Almas, ribeirão dos Almeidas, córrego Capão da Olaria, ribeirão das Minhocas e os córregos Pari Velho e Engenho da Serra. Ressalta-se que até o início dos anos 60 os córregos Capão da Olaria, dos Bois, da Onça, do Servo, Campão Grande, do Fumo e Mutuca não desaguavam diretamente nas margens do rio Piumhi, mas sim no grande pantanal percorrido por esse rio.

Entre o final da década de 50 e início dos anos 60 estava sendo concluída a grande represa de Furnas, sobre o rio Grande, pertencente à bacia do Alto Paraná. Quando as comportas da usina hidrelétrica fossem fechadas, o nível da água da represa seria de tal monta que alagaria a cidade de Capitólio, em Minas Gerais, e escoariam pela região do pântano do rio Piumhi, até atingir a bacia do rio São Francisco, conectando assim duas bacias hidrográficas. Para solucionar parte desse problema e não alagar a cidade foi construído um dique para conter as águas da represa de Furnas, nas imediações do município de Capitólio (Dique de Capitólio). Entretanto, esse dique também represou as águas do rio Piumhi, que naquela época era um dos afluentes da margem direita do rio Grande. Aproveitando a topografia da região do pantanal - por onde corria o leito do rio Piumhi, suas lagoas marginais e seus 22 afluentes - foi efetuado um sistema de drenagem, com a construção de aproximadamente 18 Km de canais, alterando o curso do rio Piumhi, desviando as suas águas e as do pântano para o córrego Água Limpa, que deságua na margem esquerda do ribeirão Sujo, um dos afluentes da margem direita do rio São Francisco.

Para efetuar o desvio, foi necessário alterar o leito do córrego Água Limpa, que foi totalmente dragado e alargado para receber todo o volume de águas vindas do rio Piumhi, de seus afluentes e da drenagem do pântano. O mesmo procedimento teve de ser feito em parte do leito do ribeirão Sujo

Na parte inferior da bacia do rio Piumhi, na região do dique, formaram-se sucessões de grandes lagos interligados, cujas águas também foram desviadas para um dos canais do rio Piumhi (canal de refluxo), o qual se junta ao canal construído sobre o córrego Água Limpa.

Assim, a transposição do rio Piumhi, da bacia do rio Grande para a bacia do rio São Francisco, acarretou diversas alterações ambientais, tais como:

- A formação de um conjunto de lagos no antigo leito do rio Piumhi, na região do município de Capitólio;
- A construção de canais, por onde corre atualmente o rio Piumhi;
- A drenagem do pântano;
- A alteração dos leitos dos córregos e ribeirões.

No álveo abandonado do rio Piumhi, a mata ciliar foi derrubada e substituída por pastagens. Hoje, o rio Piumhi corre por canais totalmente desprovidos de mata ciliar e, evidentemente, tudo isso modificou a paisagem da região, associado à ausência de estudos e às negligências quanto à degradação ambiental ali observada.

Inevitavelmente, a transposição de águas colocou em contato peixes de distintas bacias hidrográficas, que estavam separados há milhões de anos. Assim, toda a ictiofauna do rio Piumhi (bacia rio Grande), que representava uma parcela da ictiofauna do sistema hídrico Alto Paraná, foi transposta para a bacia do rio São Francisco. Dentre todos os impactos ambientais ocasionados pela transposição do rio Piumhi para a bacia do rio São Francisco, a mistura das duas ictiofaunas, sem dúvida alguma, é o que mais chama a atenção dos ictiólogos (Moreira-Filho & Buckup, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando as peculiaridades geomorfológicas das diversas bacias brasileiras e a grande variação cariotípica encontrada no grupo *H. malabaricus*, assim como a grande conservação cariotípica do grupo *H. lacerdae*, se torna necessária a caracterização citogenética desses táxons em localidades até então não amostradas. É evidente que esses estudos são importantes não só para análises adicionais quanto à evolução cariotípica desses grupos, mas também para contribuir no tocante à sua taxonomia.

Com relação ao grupo *H. lacerdae*, a obtenção de marcadores cromossômicos específicos para as espécies recentemente reconhecidas e descritas para esse grupo (Oyakawa & Mattox, 2009), pode fornecer subsídios úteis para a sua taxonomia. Tal análise poderia ser executada confrontando, por exemplo, os dados obtidos entre populações de distintas bacias hidrográficas. Já no que se refere ao grupo *H. malabaricus*, a caracterização citogenética de novas populações alopátricas poderá ampliar o mapeamento e a distribuição dos cariomorfos, principalmente em locais ainda desconhecidos, como nos afluentes das bacias do rio São Francisco, Xingu e Araguaia/Tocantins. Neste contexto, esta análise poderá também evidenciar um possível deslocamento de cariomorfos na região de transposição do rio Piumhi.

## 3. OBJETIVOS

Assim sendo, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão da evolução cariotípica e distribuição geográfica dos grupos *H. lacerdae* e *H. malabaricus*, este projeto teve como objetivo específico a caracterização citogenética de componentes destes grupos procurando:

- Analisar as características cromossômicas de espécies do grupo *H. lacerdae* na busca de marcadores citogenéticos espécie-específicos.

- Caracterizar os cariomorfos de *H. malabaricus* encontrados na bacia do rio São Francisco, enfatizando a região de transposição do rio Pimhi (MG).
- Caracterizar populações alopátricas do grupo *H. malabaricus* provenientes das bacias do rio Araguaia/Tocantins e Xingu.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material e Locais de Coleta

Foram estudados exemplares de diferentes populações do gênero *Hoplias*, com ênfase em espécimes do grupo *H. malabaricus* (Fig.1) provenientes das bacias do rio São Francisco (MG), Alto Paraná (MG) (Fig.4), Araguaia/Tocantins (GO) e Xingu (MT) (Fig.5); e em espécies do grupo *H. lacerdae*, mais especificamente *Hoplias aimara* (Fig.2) e *Hoplias intermedius* (Fig. 3), provenientes das bacias do rio Xingu (MT) e São Francisco/Alto Paraná (MG), respectivamente. O número de espécimes analisados de cada localidade está indicado nos capítulos 1, 2 e 3.





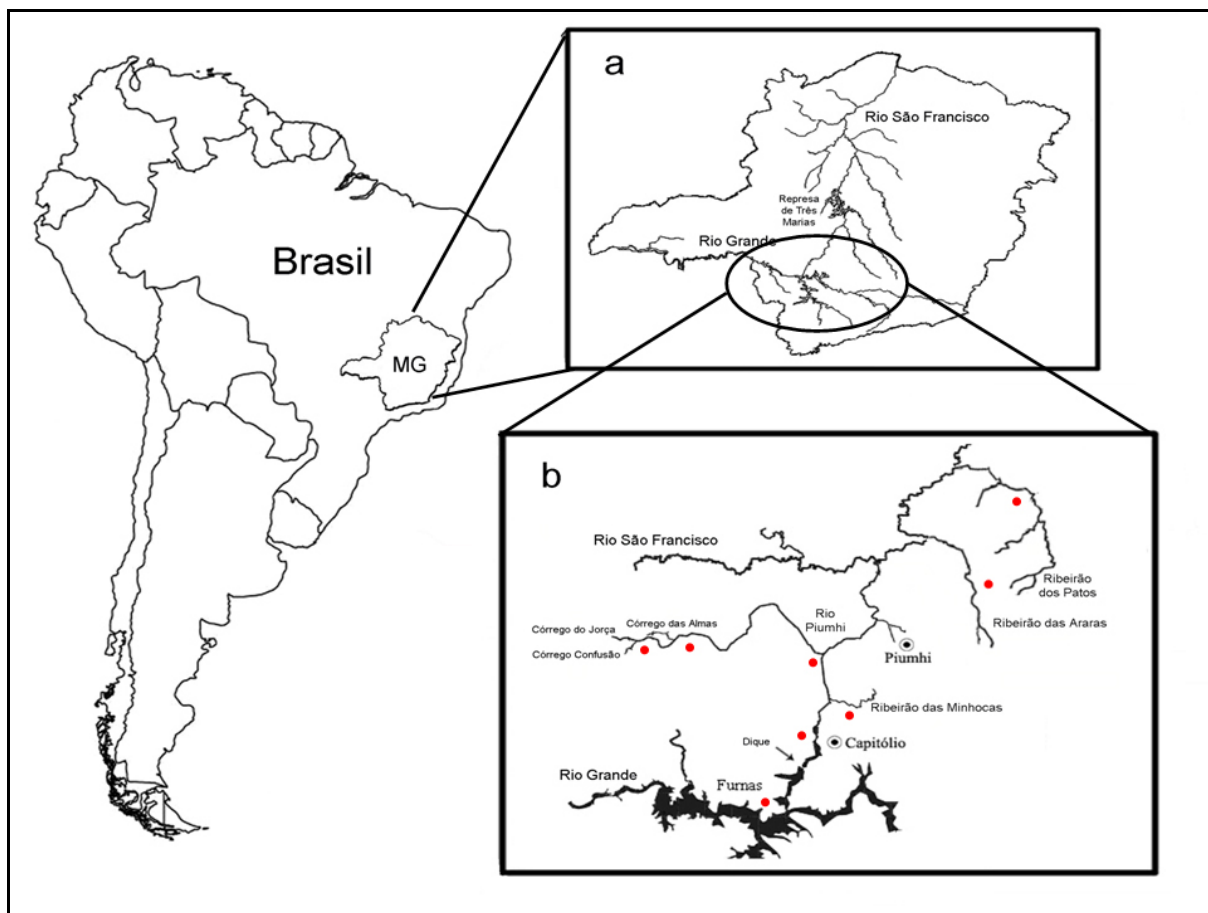
**Figura 1** – Exemplo do grupo *Hoplias malabaricus* medindo 27 cm



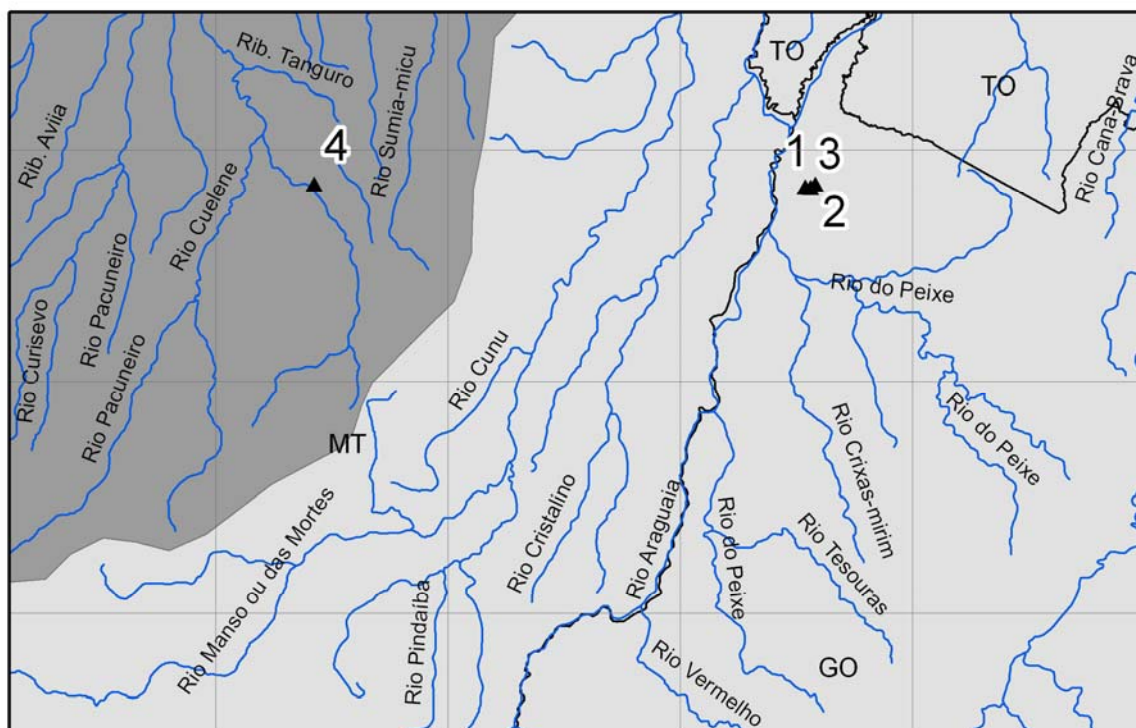
**Figura 2** – Exemplo de *Hoplias aimara* medindo 76 cm.



**Figura 3** – Exemplo de *Hoplias intermedius* medindo 42 cm.

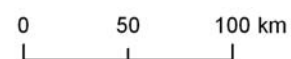


**Figura 4** - Mapa das regiões de coleta na bacia do Alto Paraná e do São Francisco. (a) Estado de Minas Gerais, mostrando o rio Grande e o rio São Francisco. (b) Localidades de coleta em ambas as bacias, com ênfase na região de transposição do rio Piumhi (Blanco *et al.*, 2009). Os círculos vermelhos indicam os pontos de coleta.



### Legenda

- ▲ Pontos de Coleta
- Hidrografia
- Bacia Araguaia/Tocantins
- Bacia Amazônica



**Figura 5** – Mapa com os pontos de coleta na bacia do rio Araguaia e do rio Xingu (bacia Amazônica). Os pontos 1, 2 e 3 referem-se aos afluentes do rio Araguaia e o ponto 4 refere-se às lagoas marginais do rio Sete de Setembro

## **4.2. Metodologia**

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas, redes de espera e varas de pesca. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas, para o laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, onde foram mantidos em aquários até serem processados para a obtenção dos cromossomos.

### **4.2.1. Obtenção de mitoses por tratamento “in vivo”**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior e posterior, por meio das técnicas descritas por Bertollo *et al.*, (1978) e Foresti *et al.*, (1993).

Foi injetada no animal, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso. Posteriormente, o peixe foi mantido em aquário bem arejado durante 50 – 60 minutos. Decorrido esse tempo, o animal foi sacrificado e retiradas porções do rim anterior. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), e transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10 ml desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, incubou-se esta suspensão a 36 - 37°C, durante vinte minutos. Em seguida, o material foi re-suspendido, com cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida transferida para um tubo de centrífuga. Algumas gotas de fixador, recém preparado (metanol ; ácido acético – 3 : 1) foram acrescentadas ao material que foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm, descartando o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Adicionou-se, vagarosamente, 5-7ml de fixador, deixando

escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento se repetiu por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador, misturando bem o material. Este foi guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Ependorff”, ou trabalhado conforme a descrição abaixo:

Três a quatro gotas da suspensão obtida foram pingadas sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa previamente mantida em água destilada aquecida entre 55 – 60°C, por cerca de 1 minutos. O excesso de material foi eliminado inclinando-se um pouco a lâmina sobre um papel de filtro, seguindo-se a secagem diretamente ao ar. Os cromossomos foram corados com Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 a 8 minutos, seguindo-se a lavagem da lâmina com água destilada e a secagem ao ar.

#### **4.2.2. Obtenção de mitoses por tratamento “in vitro”**

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior e posterior, por meio das técnicas descritas por Foresti *et al.*, (1993).

Fragmentos do rim foram colocados em 10 ml de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida será transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se 1 – 2 gotas de solução de Colchicina 0,016%, misturando-a bem com o material. O material foi então transferido para estufa a 36°C, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 500 – 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Esse material foi transferido novamente para estufa a 36°C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 6 gotas de fixador (metanol ; ácido acético – 3:1) misturado-as com o material repetidas vezes,

deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm. O sobrenadante desprezado e adicionado 10 ml de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação, por 10 minutos e repetida a fixação por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Por fim, gotejou-se o material sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 25 – 30 °C. Após a secagem ao ar, seguiu-se a coloração do material com solução Giemsa 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 – 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

#### **4.2.3. Indução do aumento do número de mitoses: suspensão de leveduras**

Para se obter uma boa análise cromossômica, fez-se necessário a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Uma vez que o órgão utilizado, o rim anterior, possui função hematopoiética, ou seja, produzir células sanguíneas, tanto as de defesa como as de transporte de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, foi utilizado aumento na frequência de mitoses nas células de defesa (suspensão de levedura), segundo Cavallini & Bertollo (1988).

Injetou-se, intraperitonealmente, suspensão de levedura (0,5 g de fermento de padaria + 1,5 g de dextrose + 6 ml de H<sub>2</sub>O) na proporção de 1 ml/ 100 g de peso animal durante 24 horas, após o qual processou-se o material para a preparação de cromossomos mitóticos.

#### **4.2.4. Classificação cromossômica**

Os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos) conforme a relação de braços (Levan et al., 1964), onde o limite da relação de braços (RB), braço maior/braço menor, estabelecido é o seguinte:

RB= 1,00-1,70 , metacêntrico (m);

RB= 1,71-3,00 , submetacêntrico (sm);

RB= 3,01-7,00 , subteloacêntrico (st);

RB= >7,00 , acrocêntrico (a).

#### **4.2.5. Bandamento C**

O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado segundo Sumner (1972) com algumas modificações (Lui *et al.*,2009). As lâminas foram tratadas com solução de ácido clorídrico 0,2N durante 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em solução de hidróxido de bário 5% a 60 °C, por aproximadamente 1 minuto e 45 segundos. Terminado esse tratamento, as lâminas foram rapidamente lavadas em ácido clorídrico 0,2N, água destilada, e finalmente incubadas em solução salina de 2xSSC durante 30 minutos a 60 °C. Após a lavagem final com água destilada, o material foi corado com o fluorocroma Iodeto de Propídeo na proporção de 20 µL de antifading para 0,7 µL de Iodeto de Propídeo.

#### **4.2.6. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (NORs)**

Foi adotado o procedimento descrito por Howell & Black (1980). Sobre a lâmina com cromossomos adicionaram-se duas gotas de solução aquosa de gelatina (1g/100mL de água destilada e 0,5 ml de ácido fórmico) juntamente com quatro gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata (50%). A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em estufa a 60°C por um período de aproximadamente sete minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da mesma. Após a retirada da lamínula, a lâmina foi lavada em água destilada e as metáfases observadas em microscopia óptica.

#### **4.2.7. Análises seqüenciais**

Foram realizadas análises seqüenciais das metáfases, na qual a mesma lâmina que continha cromossomos corados com Giemsa (coloração convencional) foram submetidas ao bandamento C e, posteriormente, ao tratamento com nitrato de Prata. Desta forma pode-se comparar, na mesma metáfase e na maioria dos casos, os três tratamentos básicos propiciando uma maior precisão na montagem dos cariótipos e identificação de caracteres marcadores.

#### **4.2.8. Coloração pelo fluorocromo G-C específico, Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>)**

A detecção de sítios predominantemente ricos em bases GC, foi realizada segundo Schmid (1980). Primeiramente foi colocado cerca de 150 µL da solução de Distamicina 0,3mg/mL sobre o material, cobriu-se com lamínula por 15 minutos. Escorreu-se a lamínula e a lâmina foi lavada em água corrente, deixando secar por poucos minutos. Em seguida, foi adicionada 150 µL de solução de Cromomicina A<sub>3</sub> (1mg/mL) e coberta com lamínula, deixando agir por 60 minutos no escuro. A lamínula foi escorrida e a lâmina lavada em água corrente. Após secar ao ar, a lâmina foi montada com uma nova lamínula utilizando 100 µL de antifading + DAPI (0,2mg/mL), como contracorante. As lâminas foram mantidas no escuro e examinadas em microscopia de fluorescência após cerca de uma semana.

#### **4.2.9. Extração de DNA com tampão salino**

A extração de DNA com tampão salino foi realizado segundo Aljanabi & Martinez (1997). O tecido foi homogeneizado (50-100mg-1cm<sup>2</sup>) em 800 µL de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris-HCl 10mM pH=8,0 e EDTA 2mM pH=8,0) usando o *Polytron Tissue Homogenizer* por 10-15s. Será adicionado 80 µL de SDS 20% (Cf=2%) e 16 µL de Proteinase K 20mg/mL (Cf=400 µg/ µL). As amostras foram incubadas a 55-65°C por pelo menos 1h ou *overnight*.



Posteriormente foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 6M. As amostras foram *vortexadas* por 30s a velocidade máxima e centrifugadas por 20 minutos a 13.000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e posteriormente foi adicionado igual volume de isopropanol. As amostras foram incubadas a  $-20^\circ$  por 1h e posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  a 13.000g. O *pellet* foi lavado com etanol 70%, 300  $\mu\text{L}$ , centrifugar por 5 minutos a 13.000g. Após secar o *pellet* foi ressuscitado em 300-500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (100  $\mu\text{L}$  = 98  $\mu\text{L}$  TE + 2  $\mu\text{L}$  de RNase 10 mg/mL).

#### **4.2.10. Prospecção de DNA repetitivo via cinética de re-associação**

Este procedimento está baseado na técnica de Cot-1 DNA (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas). O Cot-1 DNA foi isolado conforme Wei *et al.* (2005). Brevemente, o DNA genômico foi diluído para uma concentração final de 300 ng/ $\mu\text{L}$  em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra foi autoclavada ( $121^\circ\text{C}$ ,  $1,034 \times 10^5$  Pa) por 5 min para obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA foi então desnaturado a  $95^\circ\text{C}$  por 10 min e colocado a  $65^\circ\text{C}$  para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a  $37^\circ\text{C}$  por 8 min. Os fragmentos de DNA obtidos foram clonados e/ou usados como sondas para hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

#### **4.2.11. Clonagem**

As amostras de DNA provenientes das amplificações foram isoladas do gel de agarose e purificadas utilizando o kit “Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega) e posteriormente ligadas ao plasmídeo pTZ57R, utilizando-se o Kit “Ins T/Aclone PCR Product Cloning” (Fermentas), segundo as instruções do fabricante. Em um tubo estéril de 0,5 ml, foram adicionados 60 ng do fragmento de DNA de interesse previamente isolado, 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA

ligase, 5 µl de tampão de reação 2x, 1 µl do plasmídeo pTZ57R (60 ng/µl). A reação foi misturada cuidadosamente e incubada a 4°C por 12-16 horas. Em seguida, a reação de ligação foi utilizada para a transformação de células de *Escherichia coli* DH5α CaCl<sub>2</sub> competentes (Gibco.Brl Life Technologies). Foram adicionados 5 µl do produto de ligação (inserto-plasmídeo) ao tubo contendo as células competentes, misturando cuidadosamente com uma micropipeta. O tubo foi deixado durante 90 segundos em banho-maria 42°C e depois colocados imediatamente em gelo por 1 minuto. Foi adicionado ao tubo 800 µl de meio líquido LB broth (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%) e deixado sob agitação de 200 rpm por uma hora a 37°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 2 minutos a 5000 rpm e descartado o sobrenadante. Então, o restante das células do tubo foi homogeneizado e espalhado em placas de Petri estéreis contendo meio sólido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, ph 7,5) e ampicilina (100 mg/ml), além de 40 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside) (50 mg/ml) e 50 µl de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) (1 mM). As placas foram deixadas em estufa a 37°C *overnight*. As colônias bacterianas recombinantes (brancas) foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB líquido acrescidos de ampicilina (100 mg/ml). As bactérias foram deixadas *overnight* sob agitação de 200 rpm a 37°C. Os plasmídeos foram então extraídos por meio de mini-preparação plasmidial e parte da cultura de bactérias foi homogeneizada com glicerol e armazenada a -80°C.

#### **4.2.12. Seleção de clones de interesse**

Os DNAs extraídos das colônias bacterianas recombinantes (brancas) foram sujeitos a uma amplificação para a conferência da correta inserção do fragmento de DNA de interesse ao vetor pTZ57R. Nas reações de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam os genes DMRT1 e SOX9. A reação foi realizada utilizando-se 20 ng de DNA molde, 10 pmoles

de cada *primer* (sense e antisense), tampão de reação 1x (contendo Tris-HCl 200 mM pH 8.7, KCl 500 mM), 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Biocycler, de acordo com as seguintes condições: 94 °C - 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C - 1 minuto (desnaturação), 62 °C - 1 minuto (anelamento), 72 °C - 1 minuto e 30 segundos (extensão), finalizando com 72 °C - 10 minutos.

#### **4.2.13. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

As hibridações foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.*, (1986). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por nick translation segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System - Invitrogen). Os cromossomos foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 12 µL de sonda, 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 37°C, por 6 minutos cada e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 mL 20xSSC, 6 mL Triton 100, 10g not fat dry milk, 800 mL de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3.5 µL de FITC (diluição de 1:100 - Sigma) e 27 µL de tampão C (0.1M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.5 e 0.15M de NaCl) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos cada, foi realizado 3 “rounds” de amplificação do sinal utilizando uma solução de anti-avidina-biotina conjugada (2.0 µL de anti-avidina e 38 µL de 1xPBD) por lâmina, durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos, cada lâmina foi tratada com 3.5 µL de FITC (1:100) + tampão C, por 20 minutos

a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram corados com iodeto de propídio (50 µg/ml).

Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

### **Double-FISH**

Para realização da Double-FISH as sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation* ou por PCR, utilizando os compostos biotina 16 - dUTP e digoxigenina 11 dUTP (Roche), sendo cada sonda marcada com um composto distinto.

A hibridização e posterior detecção dos sinais correspondentes foram realizados da seguinte maneira: Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação (contendo as duas sondas) permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas 100 µl do “mix” contendo 94 µl de NFDm, 1 µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina) conjugada e 5 µl de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. Para a sonda marcada com biotina 16 - dU, seguiu-se a amplificação, como já descrito para a FISH convencional e ao final do processo as lâminas foram coradas com 50 µl da mistura (400 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 0,2 mg/mL) e cobertas com lamínula.

#### **4.2.14. Análises cariotípicas**

As preparações cromossômicas obtidas pela citogenética clássica foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens dos cromossomos e as observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão.

As preparações de hibridação *in situ* e as colorações com fluorocromos foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics), com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50

## 5. REFERÊNCIAS (Introdução, Materiais e Métodos).

- AB'SABER, A.N. (1957). O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e do Tietê. **Geomorfologia** 26: 39-49.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. (Eds.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo. Universidade de São Paulo, 535p, 1999.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO JR., H.F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 380p, 2004.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res.** 25:4692-4693
- ALMEDA-TOLEDO, L.F. (1998). Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M. & Lucena, C. A. S. eds. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, pp. 583-588.
- ANA (2009). Agência Nacional de Águas. Plano Estratégico de Recursos Hídricos das Bacias dos rios Tocantins e Araguaia. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/GestaoRecHidricos/PlanejHidrologico/pbhta/apresentacoes/2Reuniao-25-09-06/Documentos/unidades/Apresentacao.PDF>>. Acessado em 20 de fevereiro de 2009.
- ANA (2009). Agência Nacional de Águas. Secretaria Nacional de recursos Hídricos. Disponível em: <[http://www.portalbrasil.net/brasil\\_hidrografia.htm](http://www.portalbrasil.net/brasil_hidrografia.htm)>. Acessado em 15 de julho de 2009.
- AZEVEDO, P.; GOMES, A.L. (1943). Contribuição ao estudo da Traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Boletim de Indústria Animal**, 5: 15-64.
- BERTOLLO, L.A.C. (1978). **Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae)**. PhD thesis, Universidade de São Paulo.

- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil. J. Genet.** 2: 103-120.
- 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. **Chrom. Res.** 8: 603-613.
- BONETTO, A.A. (1986). The Paraná River Systems.11. In: Davies B.R. E Walker, K.F. (eds). **The Ecology of River Systems**. The Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 541-555.
- CAVALLINI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. (1988). Indução de mitoses em *Hoplias* cf. *malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais**, Maringá, Pr. P.32.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia** 54: 253-260.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; BUCKUP, P.; MOREIRA-FILHO, O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas** 138: 213-218.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘in vitro’ short treatment with colchicine. **Experientia**. 49: 810-813.
- GALETTI JR.; P.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. (1994). Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**. 47: 289-297.
- GAYET, M.; JÉGU, M.; BOCQUENTIN, J.; NEGRI, F.R. (2003). New characoids from the upper Cretaceous and Paleocene of Bolivia and the Mio-Pliocene of Brazil: phylogenetic position and paleobiogeographic implications. **J. Verteb. Paleont.** 23: 28-46.

- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.
- IBAMA (2009a). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Bacia do Prata. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b\\_doprata.htm](http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doprata.htm)>. Acessado em: 26 de maio de 2009.
- IBAMA (2009b). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis. Bacia Araguaia-Tocantins. Disponível em : <[http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b\\_doaraguaiatocantins.htm](http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doaraguaiatocantins.htm)>. Acessado em: 20 de junho de 2009.
- IBAMA (2009c). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis. Bacia Araguaia-Tocantins. Disponível em : <[http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b\\_dosaofrancisco.htm](http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_dosaofrancisco.htm)>. Acessado em 16 de junho de 2009.
- INNOCÊNCIO, N.R.(1989). Hidrografia. In: **Geografia do Brasil, Região Centro-Oeste**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Rio de Janeiro, 1:73-90.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52:201-220.
- LUI, R.L., BLANCO, D.R., MARGARIDO, V.P. & MOREIRA-FILHO, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron**. 40(5-6):552-559.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazil. J. Genet.** 14: 331-357.
- MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P.A. (2005). A poorly case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neot. Ichthyol.** 3(3):449-452.



- MORELLI, S.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. (2007). Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Braz. J. Biol.** 67(Suppl.): 897-903
- 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(2):117-140.
- PAIVA, M.P. (1982). **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra editorial, 292.
- PAZZA, R.; JÚLIO JR., H.F. (2003). Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná River floodplain (Brazil). **Cytologia** 68:159-163.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 2934-2938.
- SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G. (1999). **Peixes da bacia Amazônica**. R.H. Lowe-McConnell, Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Edusp, São Paulo, 345-373.
- SATO, Y.; GODINHO, H.P. (1999). Peixes da Bacia do Rio São Francisco. In: LOWE-McCONNEL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 534.
- SCHMID, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 7:83-103.
- SILVA, P.A.; VIEIRA, G.G.; FARINASSO, M.; CARLOS, R.J. (2003). Determinação da extensão do rio São Francisco. **Anais do XI SBSR**. Belo Horizonte, 393-400.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75:304-306.

- VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. (1998). Neotropical ichthyology: An Overview. **Phylogeny in the classification of neotropical fishes** (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, C.A.S. Lucena, Eds.). Edipucrs, Porto Alegre, 1-11.
- VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenet. Genome Res.** 101:24-28.
- WEI, W.H.; ZHAO, W.P.; WANG, L.J.; CHEN, B.; LI, Y.C.; SONG, Y.C. (2005). Karyotyping of *Brassica napus* L. based on Cot-1 DNA banding by fluorescence in situ hybridization. **J. Integ. Plant. Biol.** 47:1479-1484.

# CAPÍTULO I

## CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES POSSIVELMENTE INVASORAS EM REGIÃO DE TRANSPOSIÇÃO DE RIOS: ESTUDO DA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NO GÊNERO *Hoplias* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).

BLANCO, D.R., LUI, R.L., BERTOLLO, L.A.C., DINIZ, D. & MOREIRA-FILHO, O. (2009). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, doi: 10.1007/s11160-009-9116-3 (Anexo I)

## Resumo

Foram analisados os cariótipos de peixes do gênero *Hoplias*, grupos *H. malabaricus* e a espécie *H. intermedius*, da bacia do rio São Francisco (Brasil), em região impactada por uma transposição de rio originário da bacia do Alto Paraná, alterando a ecologia e a ictiofauna local. Os cromossomos foram investigados utilizando-se marcadores obtidos pela citogenética clássica (coloração Giemsa, bandamento C e Ag-NORs) e molecular (CMA<sub>3</sub> e FISH com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e DNA satélite 5SHindIII). Dois cariomorfos foram encontrados para o grupo *H. malabaricus*, o cariomorfo F correspondente à forma nativa da bacia do São Francisco e o cariomorfo A, correspondente à uma forma invasora da bacia do Alto Paraná. Espécimes de *H. intermedius* mostraram marcantes diferenças cromossômicas em relação ao grupo *H. malabaricus*, possibilitando uma boa caracterização citotaxonômica e inferências sobre a evolução cariotípica desses grupos.

**Palavras-chave:** *H. malabaricus*, *H. intermedius*, cariótipo, citotaxonomia, invasão biológica.

## Introdução

A Hidroelétrica de Furnas foi a primeira usina de grande porte construída no Brasil e fez parte de um projeto que tinha por objetivo sanar a crise energética que ameaçava os três maiores centros socioeconômicos brasileiros (nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte) em meados da década de 50 (Moreira-Filho & Buckup, 2005). Sua construção no rio Grande (bacia do Alto Paraná) entre os municípios de São José da Barra e São João Batista, no interior do estado de Minas Gerais, Brasil, era de fundamental importância para o desenvolvimento da região Centro-Oeste na época. Porém, quando as comportas fossem fechadas para formação do reservatório de Furnas, o volume de água da represa seria capaz de inundar parte da cidade de

Capitólio (Moreira-Filho, 2006). Com o objetivo de evitar esses problemas foi construído um dique próximo à cidade de Capitólio, que conteve as águas do reservatório de Furnas e foi necessário represar as águas de um afluente da margem direita do rio Grande, o rio Piumhi. Para efetuar essa transposição foi necessária a construção de canais desviando o curso do rio Piumhi, para a bacia do rio São Francisco (Moreira-Filho & Buckup, 2005; Moreira-Filho, 2006)(Fig1).

Como consequência dessa transposição, a ictiofauna do rio Piumhi e de seus afluentes, que representa parte das espécies de peixes da bacia do rio Grande, foi transferida para a bacia do rio São Francisco, causando uma mistura de ictiofaunas que estavam separadas (Moreira-Filho, 2006). Dentre os grupos de peixes que podem ter sofrido graves impactos decorrentes desta ação antrópica, estão os representantes da família Erythrinidae.

Esta família é composta por três gêneros: *Hoplerythrinus*, *Erythrinus* e *Hoplias*, que se destacam por sua grande distribuição biogeográfica. Baseado em dados morfológicos, são consideradas oito espécies para o território brasileiro, sendo cinco representantes do gênero *Hoplias* (Oyakawa & Netto-Ferreira 2007). *Hoplias* é o gênero mais difundido no continente Sul-Americano e, para a região Sudeste, são considerados dois grandes grupos: *H. malabaricus* e *H. lacerdae*. Embora *H. lacerdae* e *H. malabaricus* sejam morfológicamente similares, há algumas características morfológicas que as diferenciam: as linhas do dentário que formam a região gular convergem na região anterior em *H. malabaricus*, formando um “V” e em *H. lacerdae* tais linhas se dispõem paralelamente. Adicionalmente, esses grupos exibem diferenças marcantes tanto no número quanto na morfologia dos cromossomos, apresentando variações cariotípicas de interesse para estudos evolutivos e citotaxonômicos (Bertollo *et al.*, 2000; Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz & Bertollo, 2003).

Segundo Bertollo *et al.* (2000), *H. malabaricus* deve constituir um complexo de espécies pela conspícua diversidade cariotípica. Sete formas cariotípicas, ou cariomorfos (A-G) são claramente identificados com base no número diplóide, morfologia cromossômica e sistemas de

cromossomos sexuais. Enquanto alguns cariomorfos mostram uma ampla distribuição geográfica nas distintas bacias hidrográficas da América do Sul, outros se apresentam endêmicos podendo, inclusive, ocorrer cariomorfos em condição de simpatria, sem a detecção de formas híbridas (Tab. 1). Contrariamente, representantes do grupo *H. lacerdae* evidenciam uma evolução cariotípica mais conservada, pelo menos quanto aos espécimes até então analisados demonstrando um número diplóide igual à  $2n=50$  cromossomos meta-submetacêntricos, sem sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (Bertollo *et al.*, 1978; Bertollo & Moreira-Filho, 1983; Morelli *et al.*, 2007).

No presente trabalho foram caracterizados, por procedimentos citogenéticos clássicos e moleculares, representantes do grupo *H. malabaricus* e *H. intermedius* na região de transposição do rio Piumhi. Os resultados obtidos possibilitaram inferir sobre as conseqüências desta transposição na atual composição da ictiofauna regional, pertencente à bacia do rio São Francisco (MG, Brasil).

## Material e Métodos

Espécimes do gênero *Hoplias*, foram coletados em diversos pontos (represa de Furnas, lagoa dos Tropeiros, ribeirão das Minhocas, ribeirão das Araras, córrego das Almas, córrego Confusão, córrego do Jorça e córrego Água Limpa), localizados na região de transposição do rio Piumhi, totalizando quarenta e dois exemplares (Fig.1). Desses, nove eram representantes do grupo *lacerdae* (seis machos e três fêmeas) e trinta e três do grupo *malabaricus* (vinte machos e treze fêmeas). Adicionalmente, dezoito exemplares do grupo *malabaricus* (quatro machos e quatorze fêmeas), foram também coletados na barragem de Três Marias – MG.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993) e classificados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), de acordo com a relação de braços (Levan *et al.* 1964). O número fundamental (NF) foi

calculado considerando cromossomos metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) como portadores de dois braços cromossômicos. A distribuição da heterocromatina C-positiva e das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foi analisada conforme Sumner (1972) com modificações (Lui *et al.*, 2009) e Howell & Black (1980), respectivamente, utilizando-se das mesmas metáfases anteriormente coradas com Giemsa (análise seqüencial). A ocorrência de sítios cromossômicos ricos em GC ou AT foram investigados pelos fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente, segundo Schmid (1980). Híbridações *in situ* fluorescentes (FISH) foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de rDNA 18S (Hatanaka & Galetti Jr 2004), rDNA 5S (Martins & Galetti Jr., 1999) e DNA satélite 5SHindIII (Martins *et al.*, 2006). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por nick translation segundo as insnstruções do fabricante (Bionick Labelling System - Invitrogen). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

## **Resultados**

### **Grupo *Hoplias malabaricus* (Trairas)**

Dos cinquenta e um exemplares analisados do grupo *malabaricus*, trinta e três foram pertencentes ao cariomorfo A e dezoito ao cariomorfo F, conforme classificação adotada por Bertollo *et al.* (2000).

**Cariomorfo A** – Todos os espécimes pertencentes a este cariomorfo apresentaram  $2n=42$  cromossomos (22m + 20sm), NF = 84, tanto em machos como em fêmeas, sem heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo, sendo provenientes do ribeirão das Minhocas, represa de Furnas, córrego das Almas, córrego Confusão, córrego do Jorça e ribeirão dos Patos, o que demonstra sua predominância em tais pontos (Fig.1). O bandeamento C evidenciou bandas

pericentroméricas na maioria dos cromossomos, sendo que alguns cromossomos também apresentaram bandas terminais. Destaca-se claramente o par submetacêntrico nº 17, portador de uma grande banda na região terminal dos braços longos, correspondente à região organizadora do nucléolo (Ag-NOR). Uma única banda fluorescente GC-rica foi identificada no cariótipo, presente na região pericentromérica do par 16. Nenhuma banda AT-rica foi evidenciada. A hibridação *in situ* com sonda de rDNA 5S evidenciou dois pares de cromossomos portadores destes sítios, sendo um deles o metacêntrico nº 10 na região intersticial do braço longo, e o outro o submetacêntrico nº 13, ambos proximais ao centrômero. Os sítios de rDNA 18S foram evidenciados em três pares de cromossomos, ou seja, o par submetacêntrico nº 17 (na região terminal dos braços longos), o par submetacêntrico nº 16 (região proximal dos braços longos) e o par metacêntrico nº 6 (com sítios bi-teloméricos, ou seja, localizados em ambos os telômeros) (Fig.2). Os sítios do DNA satélite 5S *Hind*III foram localizados em nove pares de cromossomos (metacênticos 1, 5, 6 e submetacênticos 12, 13, 14, 18, 19 e 21), todos na região centromérica. (Fig.3)

**Cariomorfo F** – Todos os espécimes pertencentes a este cariomorfo foram caracterizados por apresentarem  $2n=40$  cromossomos (18m + 22sm),  $NF = 80$ , nos machos e nas fêmeas, sem sistema de cromossomos sexuais diferenciados, sendo provenientes da represa de Três Marias – MG (Fig.1). A heterocromatina mostrou-se distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, além de pequenas bandas terminais em alguns cromossomos do cariótipo. Dois pares de cromossomos submetacêntricos, nº 12 e nº 17, evidenciaram sítios de Ag-NORs terminais nos braços longos. Regiões ricas em GC foram destacadas na região terminal dos braços longos de apenas dois pares de cromossomos, ou seja, os submetacêntricos nº 13 e 14. Nenhuma banda AT-rica foi também caracterizada neste cariomorfo. Sítios de rDNA 5S foram localizados na região intersticial dos braços longos apenas no par metacêntrico nº 5. Por sua vez,



os sítios de rDNA 18S foram identificados em quatro pares de cromossomos, ou seja, na região terminal dos braços longos dos submetacêntricos nº 11, 12 e 17, e em ambas as regiões terminais (sítios bi-teloméricos) no metacêntrico nº 3 (Fig.2). O DNA satélite 5S*Hind*III foi localizado nas regiões centroméricas de 10 pares de cromossomos (metacêntricos nº. 2, 5, 7 e submetacêntricos nº 10, 11, 14, 15, 17, 19 e 20) (Fig.3).

### **Grupo *Hoplias lacerdae* (Trairão)**

Os espécimes coletados pertencentes ao grupo *H. lacerdae* foram identificados como *Hoplias intermedius*, segundo Oyakawa & Mattox (2009).

***Hoplias intermedius*** - Os espécimes apresentavam  $2n=50$  cromossomos (20m + 30sm), NF=100, tanto em machos como em fêmeas, sem cromossomos sexuais diferenciados, sendo provenientes do ribeirão das Araras, Córrego Água Limpa e represa de Furnas (Fig.1). O bandeamento C evidenciou heterocromatina posicionada preferencialmente em regiões pericentroméricas de quase todos os cromossomos do cariótipo, além de algumas bandas em posição terminal (par 12). A coloração com nitrato de prata evidenciou apenas um único par de regiões organizadoras do nucléolo ativas, situadas intersticialmente nos braços longos do par submetacêntrico nº 17, próximas ao centrômero. Neste grupo foi identificado um número maior de sítios cromossômicos ricos em pares de bases GC, comparativamente ao grupo *malabaricus*. Assim sendo, sítios proeminentes foram observados na região proximal ao centrômero dos pares 4, 6, 7 e 13, além de alguns outros menos conspícuos nos pares 9, 10 e 23. Não foi também caracterizada nenhuma região cromossômica AT-rica. A hibridação *in situ* evidenciou sítios de rDNA 5S nos braços longos do par submetacêntrico nº 19, proximais ao centrômero. Apenas o par cromossômico nº 17 apresentou sítios de rDNA 18S, localizados na região correspondente às Ag-NORs (Fig.2). Nenhum sítio do DNA satélite 5S*Hind*III foi detectado nessa espécie pelas hibridizações *in situ*.

## Discussão

### I. Caracterização Cariotípica

Conforme os dados obtidos, os espécimes analisados de Erythrinidae da bacia do São Francisco apresentam características cromossômicas que os enquadram nos cariomorfos A e F do grupo *H. malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000) e no grupo *H. lacerdae* (Morelli *et al.*, 2007). De fato, além do número cromossômico e da macroestrutura do cariótipo, vários marcadores cromossômicos empregados reforçaram esta identificação (Fig. 2, Fig. 4).

Em todos os cariomorfos do complexo *H. malabaricus* a heterocromatina tem sido usualmente localizada na região pericentromérica e terminal de alguns pares cromossômicos (Dergan & Bertollo, 1990; Haff *et al.*, 1993; Bertollo *et al.*, 1997a,b; Born & Bertollo, 2000; Vicari *et al.*, 2005), conforme também verificado no presente estudo. Entretanto nos exemplares de *H. intermedius* a heterocromatina foi observada na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, havendo somente um par com marcação terminal, podendo assim, ser considerado um relevante marcador na distinção entre os grupos *H. malabaricus* e *H. intermedius* (Fig.2, Fig.4). Por sua vez, a localização e a quantidade de sítios heterocromáticos ricos em GC, foram também marcadores importantes na caracterização e identificação dos grupos estudados. Assim, os espécimes dos cariomorfos A e F de *H. malabaricus* diferenciaram-se pela presença de um único sítio pericentromérico e dois sítios terminais, respectivamente, enquanto que os exemplares de *H. intermedius* apresentaram um maior número de sítios, localizados em sete pares cromossômicos (Fig.2, Fig.4).

Igualmente, os padrões de NORs foram importantes marcadores diferenciais. Em *H. malabaricus*, foram encontrados dois sítios de Ag-NORs e um total de seis sítios de rDNA 18S no cariomorfo A, enquanto que para o cariomorfo F foram encontrados quatro sítios de Ag-NORs e dez sítios de rDNA 18S, sempre na região telomérica de cromossomos submetacêntricos. Por outro lado, em *H. intermedius* foram encontrados apenas dois sítios de

Ag-NORs e de rDNA 18S, presentes nos braços longos de um par submetacêntrico, na região proximal ao centrômero (Fig.2, Fig.4). Entretanto, embora a ocorrência de NORs múltiplas teloméricas seja uma característica comum no grupo *H. malabaricus*, NORs intersticiais podem ser também encontradas com menor frequência nesse grupo. (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2001; Vicari *et al.*, 2005; Born & Bertollo, 2006), assim como em outros gêneros de Erythrinidae, como é o caso de *Hoplerythrinus* (Diniz & Bertollo, 2003).

As diferenças observadas nos cariomorfos de *H. malabaricus* quanto ao número de Ag-NORs e os sítios de rDNA 18S devem-se, seguramente, à uma atividade gênica diferencial entre os loci de regiões organizadoras de nucléolos presentes no cariótipo. Além da diferença numérica quanto aos sítios de NORs, os exemplares de *H. intermedius* (grupo *H. lacerdae*) também se diferenciam do grupo *H. malabaricus* pela ausência de cromossomos portadores de NORs biteloméricas, que parece ser uma característica comum para *H. malabaricus* (Fig.2, Fig.4). Usualmente, NORs múltiplas tem sido considerada como um caráter derivado em relação a um sistema de NOR simples (Almeda-Toledo & Foresti, 1985), permitindo então inferir que, para este caráter, o grupo *malabaricus* seria mais derivado em relação ao grupo *lacerdae*. A ocorrência de mais de dois sítios de rDNA 18S em espécimes do grupo *H. lacerdae* (Morelli & Bertollo, 2007) pode ser provavelmente decorrente de um processo de hibridização não-específica, necessitando de uma investigação complementar para confirmação.

Com relação ao rDNA 5S, o cariomorfo A apresentou dois pares de cromossomos marcados, enquanto que no cariomorfo F e em *H. intermeidus* esses sítios estão situados em somente um par de cromossomos. Entretanto, no cariomorfo F esses sítios se encontram em posição intersticial no braço curto dos cromossomos, e em *H. intermedius* eles ocorrem na região proximal ao centrômero (Fig.2, Fig.4). Ferreira *et al.* (2007) comparou a distribuição e localização dos clusters de rDNA 5S em três cariomorfos do grupo *malabaricus* (A, D e F), encontrando diferenças relevantes entre eles. Desta forma, o número e a distribuição dos sítios de

rDNA 5S também representam bons marcadores para os Erythrinidae. A posição pericentromérica do cluster de rDNA 5S poderia ser considerado uma condição plesiomórfica para o gênero *Hoplias* (Ferreira *et al.*, 2007), visto que em *Hoplerythrinus unitaeniatus* também encontramos esse sitio localizado na mesma posição (Diniz & Bertollo, 2003, 2006).

Finalmente, em relação à família de DNA satélite 5S*Hind*III foram caracterizados 18 sítios para o cariomorfo A e 20 sítios para no cariomorfo F, corroborando com os dados observados por Ferreira *et al.* (2007) para outras populações desses mesmos cariomorfos (Fig.3). Esta família de DNA repetitivo apresenta distribuição restrita à região centromérica de vários cromossomos, e tem sido favorecida durante a evolução do grupo *H. malabaricus* podendo exercer algum possível papel na função e/ou estrutura do centrômero de tais cromossomos (Martins *et al.*, 2006). Ferreira *et al.* (2007) demonstraram que essa família de DNA é exclusiva do grupo *H. malabaricus*, fato este confirmado no presente trabalho, visto que não foi encontrada tal seqüência nos exemplares do grupo *H. lacerdae* (*H. intermedius*).

Os grupos *H. malabaricus* e *H. lacerdae* exibem uma evolução cariotípica extremamente diferenciada (Bertollo, 2007). Os dados apresentados no presente trabalho ressaltam diferenças significantes entre esses dois grupos, assim como entre os cariomorfos A e F do grupo *H. malabaricus* (Fig.4), permitindo não só uma boa caracterização citotaxonômica de cada um desses grupos, assim como a identificação de possíveis características derivadas no grupo *H. malabaricus*.

## **II. Conseqüências da Transposição**

A quebra de barreiras naturais pode propiciar o contato entre espécies anteriormente isoladas. Este evento pode ser devido a alterações geomorfológicas naturais, promovendo a transposição de um curso d'água de uma bacia para outra adjacente, evento este denominado de captura de cabeceiras (Ab'Saber, 1957), ou devido a uma alteração artificial, oriunda de ações

antrópicas. De fato, algumas espécies de peixes, como *Serrasalmus marginatus* (Agostinho & Julio Jr., 2002), *Hoplias malabaricus* - cariomorfo C (Pazza & Júlio Jr., 2003) e *Gymnotus pantanal* (Margarido *et al.*, 2007), que eram caracterizadas como sendo da bacia do Baixo Paraná, encontram-se convivendo em simpatria com espécies nativas do Alto Paraná, após a construção da barragem de Itaipu.

O caso do rio Piumhi é um dos mais notáveis dentre todos os eventos de conexões artificiais entre bacias hidrográficas distintas, pois com a transposição deste rio, toda sua ictiofauna foi transposta para a bacia do São Francisco (Moreira-Filho & Buckup, 2005) (Fig.1). Entretanto, na mesma região, anteriormente à transposição, possivelmente já existia uma conexão natural que desempenhava um importante papel nessa mistura de ictiofaunas, embora em menor escala quando comparada à transposição do rio Piumhi. Essa hipótese encontra respaldo na análise de antigas cartas cartográficas locais, onde se pode averiguar que a nascente de alguns tributários da margem esquerda do rio Piumhi e do antigo Pantanal do Cururu, encontravam-se em altitudes similares (aproximadamente 800m) e uma pequena distância (de 400m a 1Km) dos afluentes da margem direita do rio São Francisco, na mesma região. Desta forma, é provável que, em épocas de cheias, tenham ocorrido conexões entre as águas da bacia do rio Grande com as do São Francisco, através do pantanal do Cururu, representando uma provável rota migratória natural para os peixes.

Conforme dados até então disponíveis, o cariomorfo A do grupo *H. malabaricus* apresenta ampla distribuição geográfica, estando presente do norte ao sul do Brasil, incluindo a bacia do rio Grande, atingindo o Uruguai e a Argentina (Tab. 1). Os peixes da bacia do São Francisco têm sido estudados intensamente nas última duas décadas, no tocante à citogenética. Durante todo este tempo, apenas três exemplares do cariomorfo A tinham sido identificados para esta bacia, provenientes da região de Três Marias (Bertollo *et al.*, 2000). No presente trabalho, apenas populações do cariomorfo A foram identificadas na região de transposição do rio Piumhi,

em riachos, lagoas e na calha principal desse rio. Nesta região não foi encontrado nenhum exemplar do cariomorfo F. Assim, o fato do cariomorfo A ser frequentemente encontrado no rio Grande e na região de transposição do rio Piumhi indica que este cariomorfo deve representar uma forma invasora na bacia do São Francisco, tendo se dispersado até a região de Três Marias.

Observações de campo têm evidenciado que os exemplares pertencentes ao cariomorfo A são mais agressivos que os pertencentes ao cariomorfo F, fato este que pode ter favorecido a expansão dessa forma invasora (cariomorfo A) e o conseqüente deslocamento do cariomorfo F, invadindo o habitat anteriormente ocupado por esta última forma. Entretanto, estudos ecológicos e comportamentais, associados aos dados citogenéticos, são necessários para comprovar possível competição entre esses cariomorfos.

Os dados citogenéticos clássicos e moleculares referentes à *H. intermedius* evidenciam que os espécimes coletados na região do rio Grande e na região de transposição do rio Piumhi possuem a mesma forma cariotípica. Assim sendo, é possível que conexões naturais, como, por exemplo, as que existiam no antigo pantanal do Cururu, tenham possibilitado a dispersão de espécimes desse grupo em ambas as bacias, ou seja, Alto Paraná e São Francisco. Tal espécie foi coletada apenas em riachos apresentando corredeiras e águas cristalinas, ricas em oxigênio, diferentemente de *H. malabaricus*, que foi coletada em lagoas e remansos dos canais de transposição. Segundo Rantin *et al.* (1992), exemplares do grupo *H. lacerdae* necessita de uma quantidade maior de oxigênio em relação a *H. malabaricus*, bem como aos outros gêneros de Erythrinidae. Este fato indica que a permanência de *H. intermedius* (grupo *H. lacerdae*) na bacia do São Francisco (região de transposição), sem entrar em competição com os cariomorfos de *H. malabaricus*, pode estar relacionada ao fato de ocuparem habitats diferenciados. Godoy (1975), também destaca que *H. lacerdae* e *H. malabaricus* são ecologicamente distintos, apesar de serem morfologicamente similares, reforçando a hipótese acima apresentada.

O presente estudo, com base em dados do gênero *Hoplias*, indica que a quebra de barreiras naturais entre as bacias do rio Grande e São Francisco (representada pela transposição do rio Piumhi e a provável conexão natural entre essas duas bacias – Pantanal do Cururu) pode ter causado uma alteração na organização hierárquica na ictiofauna do alto rio São Francisco.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa pela identificação dos exemplares, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Referências**

- Ab'Saber NA (1957) O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e do Tietê. *Geomorfologia* 26: 39-49
- Agostinho CS, Júlio Jr H.F (2002) Observation of an invasion of piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the Upper Paraná River, Brazil. *Acta Scientiarum* 24: 391-395
- Almeda-Toledo LF, Foresti F (1985) As regiões organizadoras do nucléolo em Peixes. *Ciência e Cultura*. 37(3): 448-453
- Bertollo LAC (1996) The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* 61: 75-81

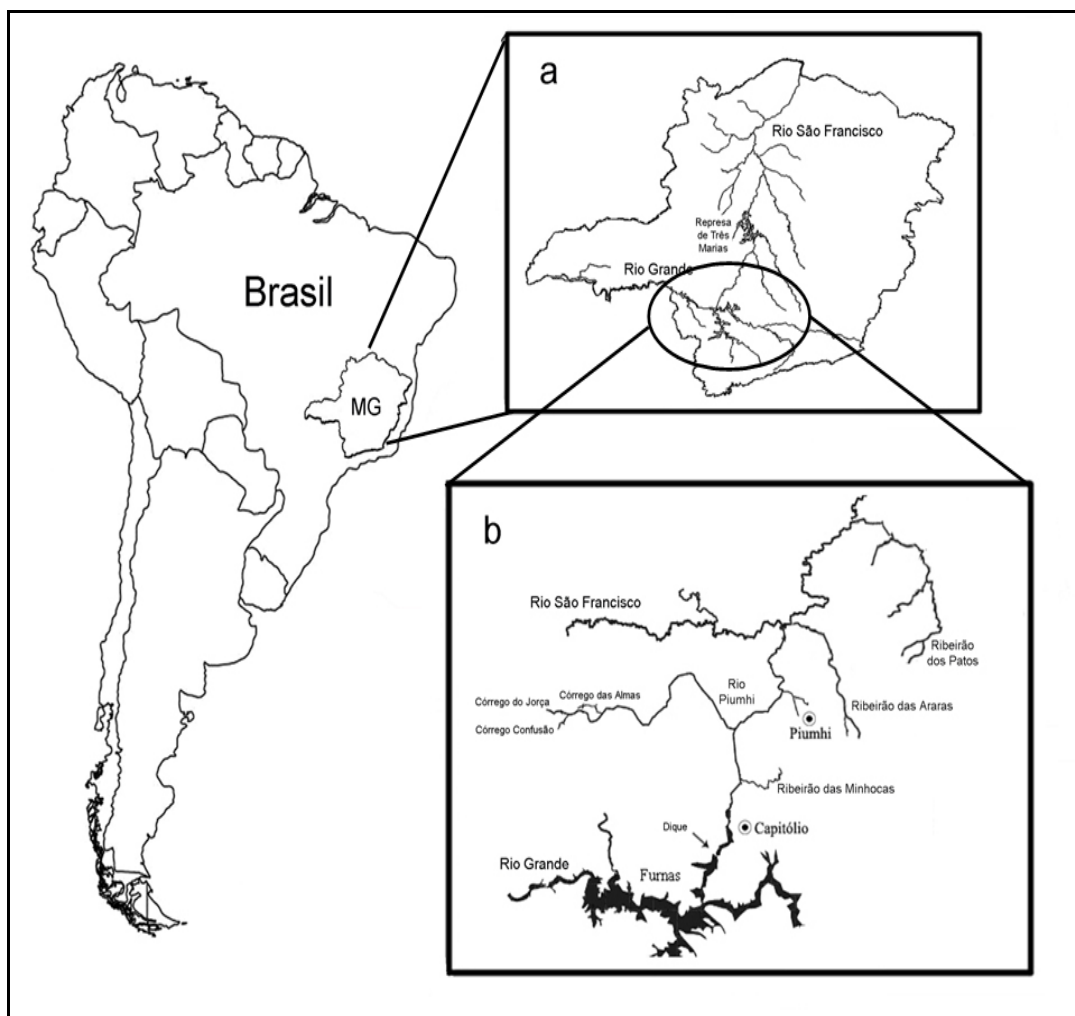
- Bertollo LAC (2007) Chromosomal evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds). Fish cytogenetics, 1st edn., Science Publishers, Enfield.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1983) Possível ocorrência de uma nova espécie do gênero *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae): evidências morfológicas e citogenéticas. Ciênc. Cult. (Suppl) 35: 685
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho, O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazil J. Genet. 1: 103-120
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio, AS, 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 LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS (1997b) Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with  $2n = 40$  chromosomes. Brazil J. Genet. 20: 237-242
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, 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
- Born GG, Bertollo LAC (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
- Born GG, Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. Genetica 110: 1-9
- Born GG, Bertollo LAC (2006) A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Brazil. J. Biol. 66: 205-210



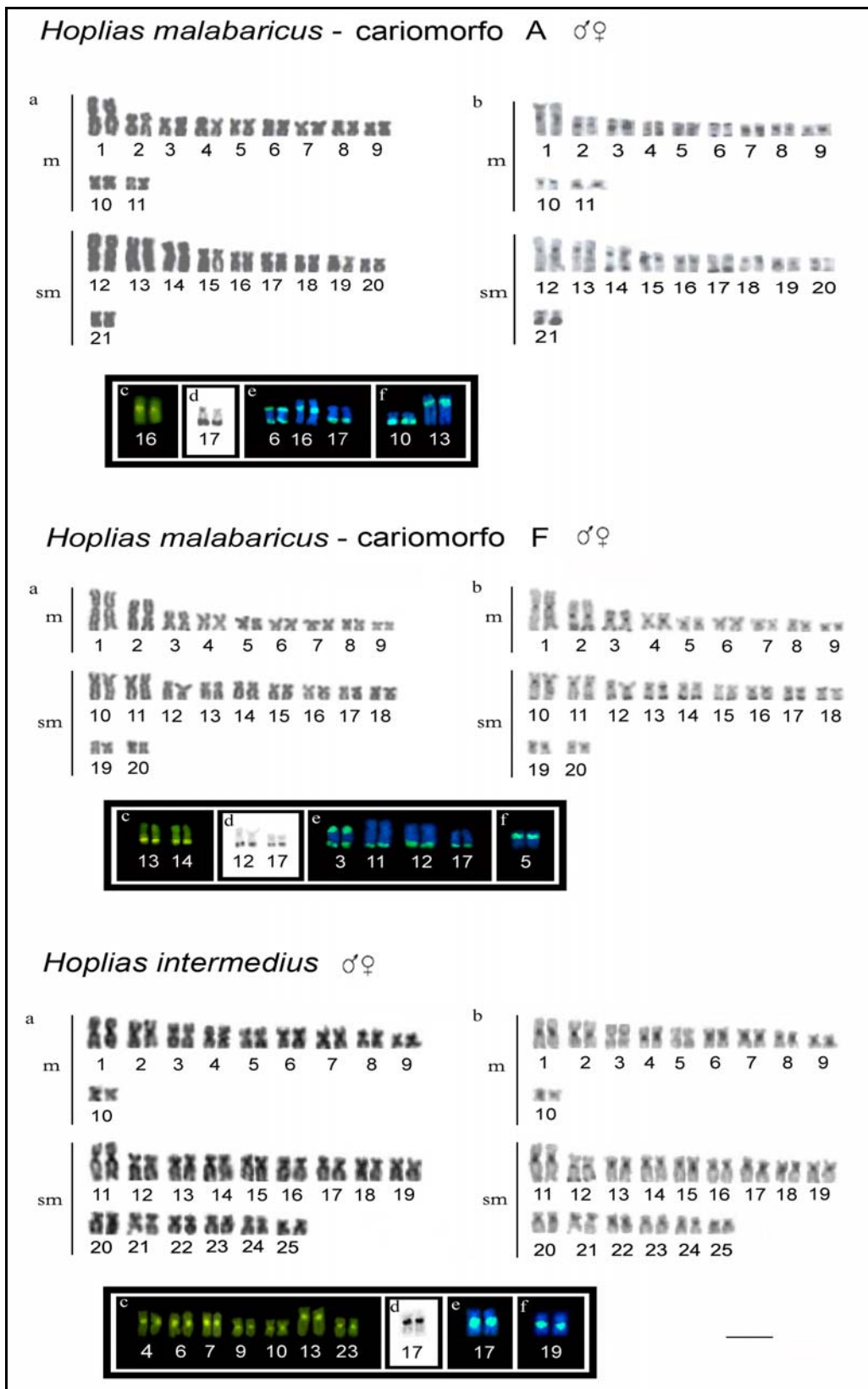
- Dergam JA, Bertollo LAC (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. J. Genet. 13: 755-766
- Diniz D, Bertollo LAC (2003) Karyotypic studies on *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. Caryologia 56: 303-313
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C (2007) Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. Cytogenet. Genome Res. 118: 78-83
- Giuliano\_Caetano L, Jorge LC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetic studies on *Hoplerhythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). Cytologia 66: 39-43
- Guiliano-Caetano L, Jorge LC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetic studies on *Hoplerhythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). Cytologia 66:39-43.
- Godoy MP (1975) Família Erythrinidae. In: Godoy MP (ed) Peixes do Brasil, subordem Characoide, vol 3. Ed. Franciscana, Piracicaba, SP, Brasil.
- Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti Jr. PM, Willard HF (1993) Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Chromosome Res. 1: 77-86
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122: 239-244
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40(5-6): 552-559.
- Margarido V P, Bellafronte E, Moreira-Filho O (2007) Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brasil. *J. Fish Biol.* 70: 155-164
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7: 363-367
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr. PM (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141
- Moreira-Filho O (2006) Uma transposição esquecida. *Rev. Uni. Fed. Goiás VIII(2): 77-82.*
- Moreira-Filho O, Buckup PA (2005) A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. *Neot. Ichthyol.* 3: 449-452
- Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC (2007) Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Braz. J. Biol.* 67(Suppl.): 897-903
- Oyakawa OT, Netto-Ferreira AL (2007) Erythrinidae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (Eds) *Catálogo das espécies de água doce do Brasil*. Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, p. 195.
- Oyakawa OT, Mattox GMT (2009) Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology* 7(2):117-140.

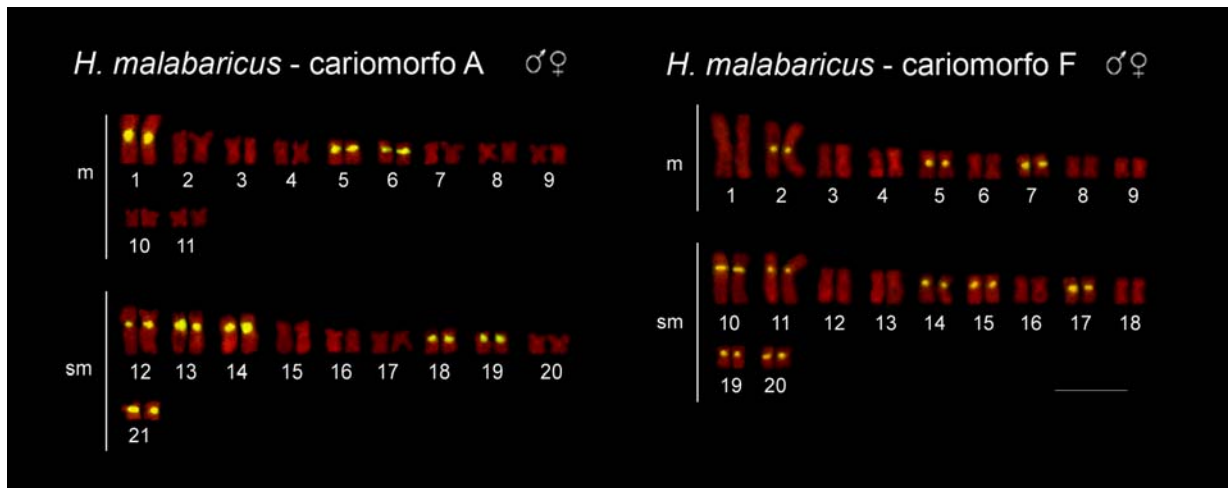
- Pazza R, Júlio Jr. HF (2003) Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná River floodplain (Brazil). *Cytologia* 68: 159-163
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 83: 2934-2938
- Rantin FT, Kalinin AL, Glass ML, Fernandes MN (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malaricus* and *Hoplias lacerdae*). *Journal of Fish Biology* 41:805-812.
- Schmid M (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 7: 83-103
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2005) Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Gen. Mol. Biol.* 28: 103-110



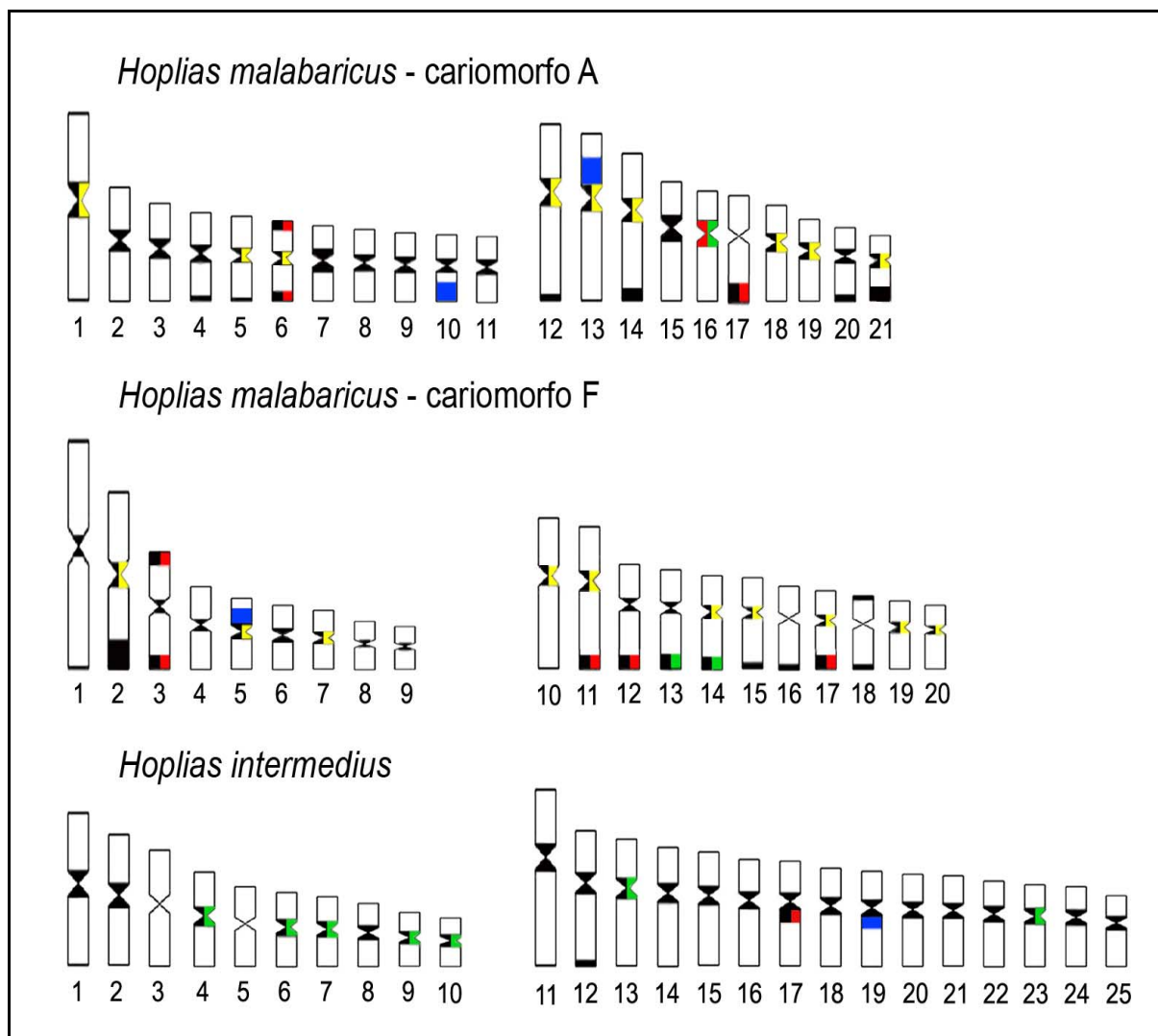
**Figura 1** – Localização dos pontos de coleta. (a) Estado de Minas Gerais, (b) Região de transposição do Rio Piumhi



**Figura 2** – Cariótipos dos exemplares analisados. (a) Giemsa. (b) Bandamento C. (c) Coloração com CMA3. (d) Ag-NOR. (e) Sítios de rDNA 18S. (f) Sítio de rDNA 5S. Barra = 5 µm.



**Figura 3** – Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNA satélite 5SHindIII. Barra = 5 µm.



**Figura 4** – Idiograma comparativo dos dois cariomorfos de *Hoplias malabaricus* e exemplar de *Hoplias intermedius*, indicando todos os marcadores utilizados. Preto = heterocromatina C-positiva, azul = sítios de rDNA 5S, vermelho = sítios de rDNA 18S, amarelo = sítios do DNA satélite 5SHindIII e verde = Cromomicina A<sub>3</sub> positiva.

**Tabela 1** – Características cromossômicas dos cariomorfos de *Hoplias malabaricus*, de acordo com Bertollo *et al.* (2000).

<b>Cariomorfo</b>	<b>2n</b>	<b>Sistema Sexuais</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>
<b>A</b>	42	Não diferenciado	Norte a Sul do Brasil, Uruuai e Norte da Argentina
<b>B</b>	42	Fêmea: XX ; Macho: XY	Restrito ao sistema de lagos do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil
<b>C</b>	40	Não diferenciado	Do Norte do Brasil ao Nordeste da Argentina
<b>D</b>	39/4 0	Fêmea: X1X2 ; Macho: X1X2Y	Aparentemente limitado ao sistema hidrográfico do Alto Paraná
<b>E</b>	42	Fêmea : desconhecido	Restrito ao rio Trombetas, Pará, Brasil
<b>F</b>	40	Não diferenciado	Do Suriname até o sudeste do Brasil
<b>G</b>	40/4 1	Fêmea: XX ; Macho: XY1Y2	Restrito a algumas localidades Amazonicas

## CAPÍTULO II

### **DIVERSIDADE CARIOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS DO GRUPO *Hoplias malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE): CONSIDERAÇÕES EVOLUTIVAS E BIOGEOGRÁFICAS.**

BLANCO DR, LUI RL, BERTOLLO LAC, MARGARIDO VP, MOREIRA-FILHO O.  
Karyotypic diversity among alopatric populations of the *Hoplias malabaricus* group  
(Characiformes, Erythrinidae): Evolutionary and biogeography considerations (Aceito para  
publicação **Neotropical Ichthyology**)



## Resumo

Três populações do grupo *Hoplias malabaricus*, provenientes de bacias hidrográficas dos rios São Francisco, Araguaia/Tocantins e Xingu, do Brasil, foram analisadas por técnicas de citogenética clássica (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e Ag-NORs) e molecular (hibridização *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e DNA satélite 5S*Hind*III). Os marcadores cromossômicos obtidos foram fundamentais para caracterizar estas populações como pertencentes ao cariomorfo A, bem como permitiram detectar claras divergências inter-populacionais. Essas diferenças provavelmente são decorrentes de histórias evolutivas distintas, resultantes de isolamentos geográficos entre as populações, associados ao modo dispersivo desses organismos, reforçando a diversidade genética presente no grupo *H. malabaricus*.

**Palavras-Chave:** Citogenética, Traira, Cariomorfo A, FISH, Isolamento geográfico

## Introdução

Erythrinidae é uma pequena família de peixes Neotropicais, amplamente distribuída pela América do Sul, atualmente composta por apenas três gêneros, *Hoplerythrinus*, *Erythrinus*, *Hoplias*, além de um gênero já extinto, *Paleohoplias assisbrasiliensis* (Gayet *et al.*, 2003).

*Hoplias* é o gênero mais difundido, no continente Sul-Americano, compreendendo dois grandes grupos, *H. malabaricus* e *H. lacerdae*. Em recente revisão Oyakawa & Mattox (2009) reconheceram 6 espécies para este último grupo: *H. intermedius*, *H. aimara*, *H. curupira*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. lacerdae*. Por sua vez, o grupo *H. malabaricus* ainda carece de uma revisão como um todo.

Por não serem considerados bons nadadores, os eritrínídeos não são capazes de transpor obstáculos tais como cachoeiras e grandes corredeiras, diferindo dos grandes peixes migradores presentes na América do Sul, tais como o dourado (*Salminus brasiliensis*), matrinxã (*Brycon* spp.) e os grandes bagres. Desta forma, tais obstáculos naturais são fatores que podem diminuir o fluxo gênico entre as populações de uma mesma bacia hidrográfica, o qual pode chegar a ser interrompido dependendo do relevo ou da geomorfologia da região. *H. malabaricus* pode ser facilmente encontrada em lagoas temporárias durante a fase de estiagem, (Okada *et al.*, 2003) visto sua alta capacidade de sobrevivência em ambientes com baixos teores de oxigênio dissolvido e temperaturas extremas da água, quando comparadas com a maior parte dos outros peixes piscívoros (Rantin *et al.*, 1992, 1993; Rios *et al.*, 2002). Em épocas chuvosas, apresenta uma alta dispersão passiva (não intrínseca da biologia do peixe, mas dependente de fatores ambientais), mudando de uma vertente de rio à outra através de filetes de água de poucos centímetros de profundidade, característica típica de alagadiços. Além disso, seus alevinos são entomófagos e canibais, não necessitando da presença de outros peixes para se alimentar, e apresentam alta resistência à fome (Azevedo & Gomes, 1943).

Os eritrínídeos apresentam variação cariotípica de interesse evolutivo (Bertollo *et al.*, 2000; Giuliano-Caetano *et al.*, 2001; Diniz & Bertollo, 2003; Bertollo *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2005). Dentro deste contexto, *H. malabaricus* destaca-se como o grupo mais estudado, com populações citogeneticamente amostradas em diferentes regiões da América do Sul, desde da Argentina até o Suriname e, principalmente, em território brasileiro (Bertollo *et al.*, 2000). Os dados obtidos caracterizam uma conspícua diversidade cariotípica, com sete cariomorfos diferenciados (A, B, C, D, E, F e G), considerando o número diplóide, morfologia cromossômica e sistemas de cromossomos sexuais. Enquanto alguns cariomorfos mostram uma ampla distribuição geográfica, outros se apresentam como endêmicos de determinadas regiões, podendo ocorrer cariomorfos em simpatria sem detecção de formas híbridas, indicando a ocorrência de

um complexo de espécies (Bertollo *et al.*, 2000). O cariomorfo A apresenta uma grande distribuição geográfica, estando presente nas principais bacias hidrográficas brasileiras: Paraná, São Francisco, Araguaia, Amazônica e as bacias do Leste. Variações cariotípicas menores, entre populações desse cariomorfo também já foram detectadas (Born & Bertollo, 2001; Vicari *et al.*, 2005; Cioffi *et al.*, 2009).

Considerando tal contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar, por metodologias de citogenética clássica e molecular, três populações alopátricas do grupo *H. malabaricus* pertencentes a três bacias hidrográficas distintas, São Francisco, Araguaia/Tocantins e Xingu. Os resultados obtidos auxiliaram no entendimento da biologia evolutiva de *H. malabaricus*, particularmente no tocante à diversificação e à conservação de caracteres cromossômicos de interesse dentro desse grupo.

## **Material e Métodos**

Oitenta e sete exemplares do grupo *Hoplias malabaricus* foram analisados citogeneticamente: 14 machos e 9 fêmeas provenientes da lagoa dos Tropeiros (bacia do rio São Francisco – região de transposição do rio Piumhi, MG), 16 machos e 20 fêmeas provenientes de lagoas marginais do rio Araguaia (bacia do Araguaia / Tocantins, GO) e 16 machos e 12 fêmeas provenientes de afluentes do rio Sete de Setembro (Bacia do rio Xingu, MT) Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo, segundo Henvey *et al.*, (2002). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1993) e classificados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), de acordo com a relação de braços (Levan *et al.*, 1964). A heterocromatina C-positiva foi evidenciada conforme Sumner (1972) com algumas adaptações (Lui *et al.*, 2009) e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) conforme Howell & Black (1980). Ambas as metodologias foram aplicadas sequencialmente, após a coloração convencional dos cromossomos com Giemsa.

Hibridações *in situ* fluorescentes (FISH) foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.*, (1986) com algumas modificações, utilizando sondas de rDNA 18S (Cioffi *et al.*, 2009), rDNA 5S e DNA satélite 5S *Hind*III (Martins *et al.*, 2006). As sondas foram marcadas com biotina-14-dATP por nick translation segundo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System - Invitrogen). Os cromossomos foram incubadas em RNase (0.4% RNase/2xSSC) por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após a desnaturação, realizada com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 minutos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100%, por 5 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 12 µL de sonda, 30 µL de formamida (concentração final de 50%), 12 µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6 µL de 20xSSC, por lâmina. A hibridação foi feita em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 37°C, por 6 minutos cada e posteriormente incubadas em 1xPBD (200 mL 20xSSC, 6 mL Triton 100, 10g not fat dry milk, 800 mL de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3.5 µL de FITC (diluição de 1:100 - Sigma) e 27 µL de tampão C (0.1M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.5 e 0.15M de NaCl) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos cada, foi realizado 3 rounds de amplificação do sinal utilizando uma solução de anti-avidina-biotina conjugada (2.0 µL de anti-avidina e 38 µL de 1xPBD) por lâmina, durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBD a 45°C por 4 minutos, cada lâmina foi tratada com 3.5 µL de FITC (1:100) + tampão C, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram corados com iodeto de propídio (50 µg/ml).

Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

## Resultados

### ***H. malabaricus* da bacia do rio São Francisco.**

Os exemplares pertencentes a esta população apresentaram  $2n=42$  cromossomos ( $22m + 20sm$ ),  $NF = 84$ , tanto em machos como em fêmeas, sem heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. O bandeamento C evidenciou bandas pericentroméricas na maioria dos cromossomos, sendo que alguns cromossomos também apresentaram bandas terminais e intersticiais. Destaca-se claramente o par submetacêntrico 17, portador de uma grande banda na região terminal do braço longo, correspondente à região organizadora do nucléolo (Ag-NORs) (Figura 1a, b, c).

A hibridação *in situ* com sonda de rDNA 5S evidenciou dois pares de cromossomos portadores de sítios intersticiais: um par metacêntrico pequeno (par 10), com sítios no braço longo e um par submetacêntrico grande (par 13), com sítios no braço curto, proximais ao centrômero (Figura 2a). Os sítios de DNA ribossomal 18S foram evidenciados em quatro pares de cromossomos: dois pares metacêntricos (pares 6 e 9), com sítios localizados na região terminal de ambos os braços cromossômicos e dois pares submetacêntricos (pares 16 e 17), com sítios nos braços longos na região proximal ao centrômero e terminal, respectivamente (Figura 2b). A hibridação com sonda de DNA satélite 5S*Hind*III identificou nove pares de cromossomos com sítios na região centromérica: três pares metacêntricos (pares 1, 5 e 6) e seis pares submetacêntricos (pares 12, 13, 14, 18, 19 e 21) (Figura 2c).

### ***H. malabaricus* da bacia do rio Araguaia.**

Os exemplares coletados em São Miguel do Araguaia apresentaram  $2n=42$  cromossomos ( $18m + 24sm$ ),  $NF = 84$ , tanto em machos como em fêmeas, não sendo observado nenhum heteromorfismo sexual. A heterocromatina apresentou-se distribuída na região pericentromérica e terminal de vários cromossomos do complemento, destacando-se claramente o par

submetacêntrico 10, portador de uma grande banda na região pericentromérica, e os pares 14 e 20 com bandas conspícuas na região terminal do braço longo. Essas últimas mostraram-se co-localizadas com as Ag-NORs (Figura 1d, e, f). A hibridação *in situ* com sonda de rDNA 5S evidenciou somente um par metacêntrico pequeno (par 8) marcado na região intersticial dos braços longos (Figura 2d). Os sítios de rDNA 18S foram evidenciados em três pares de cromossomos submetacêntricos: em um par grande (par 10), na região proximal ao centrômero e em dois pares menores (pares 14 e 20), na região terminal dos braços longos. Além disso, apenas um dos homólogos do par 10 apresentou um sítio extra, terminal no braço longo (Figura 2e). A hibridação com sonda de DNA satélite 5SHindIII identificou oito pares de cromossomos com sítios na região centromérica: dois pares metacêntricos (pares 1 e 5) e seis pares submetacêntricos (pares 10, 11, 12, 15, 16 e 21) (Figura 2f).

### ***Hoplias malabaricus* da bacia do rio Xingu**

Os exemplares coletados nos afluentes do rio Sete de Setembro apresentaram  $2n=42$  cromossomos (20m + 22sm), NF = 84, tanto em machos como em fêmeas, sem sistema de cromossomos sexuais heteromórficos. O bandeamento C evidenciou bandas pericentroméricas em quase todos os cromossomos, além de pequenas bandas terminais presentes em alguns pares. A coloração com Nitrato de Prata evidenciou três pares cromossômicos (pares 4, 9 e 15) com Ag-NORs (Figura 1g, h, i). A hibridação com sonda de rDNA 5S evidenciou somente um par metacêntrico pequeno (par 8) marcado na região intersticial dos braços longos (Figura 2g). Os sítios de rDNA 18S foram evidenciados em três pares de cromossomos, na região terminal dos braços longos: dois pares metacêntricos (pares 4 e 9) e um par submetacêntrico (par 15) (Figura 2h). A hibridação *in situ* com o DNA satélite 5SHindIII identificou 10 pares de cromossomos com sítios na região centromérica: quatro pares metacêntricos (pares 1, 5, 7 e 10) e seis pares submetacêntricos (pares 11, 12, 13, 16, 17 e 19) (Figura 2i).

## Discussão

As três populações estudadas apresentaram  $2n=42$  cromossomos, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de cromossomos sexuais heteromórficos, caracterizando o cariomorfo A (Bertollo *et al.*, 2000). Apesar de apresentarem os mesmos números diplóide e fundamental ( $NF=84$ ), as fórmulas cariotípicas das três populações evidenciaram diferenças sutis na quantidade de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figuras 1 e 3). Variações na fórmula cariotípica são comumente encontradas entre populações do cariomorfo A do grupo *H. malabaricus* (Tabela 1), provavelmente relacionadas com a ocorrência de rearranjos Robertsonianos, mais especificamente com inversões pericêntricas, (Galetti *et al.*, 1994), que podem ser fixadas em decorrência do isolamento de pequenas populações locais (evolução alopátrica).

Entretanto, considerando a estrutura geral do cariótipo, há uma maior similaridade entre as populações da bacia do São Francisco e do rio Xingu, as quais se mostram mais claramente diferenciadas da população da bacia do rio Araguaia, onde há um aumento na quantidade de cromossomos submetacêntricos em relação aos metacêntricos (Figuras 1, 3).

Bandas heterocromáticas pericentroméricas e terminais têm sido frequentemente observadas no grupo *H. malabaricus* (Dergan & Bertollo, 1990; Haaf *et al.*, 1993; Bertollo *et al.*, 1997 a,b; Born & Bertollo, 2000; Vicari *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2009), conforme também verificado nas populações do presente estudo. Entretanto, algumas especificidades na quantidade de heterocromatina e na sua localização puderam ser também constatadas. Assim sendo, a população do São Francisco apresentou bandas intersticiais características no braço longo dos três primeiros pares de cromossomos submetacêntricos, as quais se mostraram ausentes ou não tão evidentes nas outras populações. Por sua vez, somente a população da bacia do Araguaia apresentou três grandes blocos heterocromáticos nos cromossomos submetacêntricos 10, 14 e 20, os quais representam uma grande parcela da quantidade de heterocromatina do cariótipo (Figuras

1 e 3). Uma análise comparativa geral da quantidade e distribuição de heterocromatina revelou, novamente, uma maior similaridade entre as populações das bacias dos rios Xingu e do São Francisco, enquanto que a população do rio Araguaia se diferenciou por uma quantidade consideravelmente menor de heterocromatina presente no cariótipo (Figuras 1 e 3).

As três populações mostraram-se conservadas quanto ao número e localização do rDNA 5S, evidenciando um único sítio na região intersticial do braço longo de um pequeno cromossomo metacêntrico (Figuras 2 e 3). Entretanto, a população da bacia do rio São Francisco apresentou um sítio extra, proximal no braço curto de um cromossomo submetacêntrico grande (par 13). Provavelmente, um sítio proximal de rDNA 5S representa uma condição plesiomórfica em *H. malabaricus*, não sendo observada na maioria das populações já analisadas desta espécie, mas detectado em outras espécies do gênero *Hoplias*, como *H. intermedius* (citado como *Hoplias* aff. *lacerdae*), bem como em alguns outros cariomorfos/populações de *H. malabaricus* (Ferreira *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2009). A fixação dessa característica plesiomórfica reflete o grau de diversidade e divergência do grupo *H. malabaricus*, quando comparado com os demais eritrinídeos.

A família de DNA repetitivo *5SHindIII*, com localização na região centromérica de *H. malabaricus*, apresenta-se exclusiva desse grupo entre os Erythrinidae e provavelmente teve origem antes da divergência e dispersão das diferentes linhagens que originou os diferentes cariomorfos de *H. malabaricus* (Ferreira *et al.*, 2007). Para esse marcador foi encontrada variação no número de sítios entre as populações estudadas, o que pode estar relacionado com a natureza instável e a alta taxa evolutiva das seqüências repetitivas (Charlesworth *et al.*, 1994). Apesar dessa variação, alguns cromossomos mostraram evidente correspondência com relação a essa seqüência. O primeiro e o quinto par metacêntrico assim como os três primeiros submetacêntricos apresentam, consistentemente, sítios de *5SHindIII* nas três populações estudadas. Três pares cromossômicos submetacêntricos menores também apresentaram marcação



em todas as populações, alguns com correspondência entre elas (pares 18, 19 e 21 para a bacia do São Francisco, pares 15, 16 e 21 para a bacia do Araguaia, pares 16, 17 e 19 para a bacia do rio Xingu). Assim, a análise da distribuição dessa família de DNA repetitivo mostrou-se de importância para o entendimento da evolução cariotípica em *H. malabaricus*, evidenciando pares cromossômicos conservados, ao lado de alguns outros divergentes no tocante a essas seqüências, indicando diferenciações já ocorridas entre as populações analisadas.

A ocorrência de NORs múltiplas teloméricas é outra característica comum no grupo *H. malabaricus*, embora NORs intersticiais também possam ocorrer em menor frequência (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2001; Vicari *et al.*, 2005; Born & Bertollo, 2006). As populações da bacia do rio São Francisco e Araguaia apresentaram tanto sítios ribossomais terminais quanto intersticiais, enquanto a população proveniente da bacia do rio Xingu apresentou somente bandas terminais. Na maioria das populações desse grupo já estudadas não foi observada a presença de sítios intersticiais de NORs ativos (Ag-NORs), os quais se mostram usualmente restritos aos sítios terminais. Esse fato foi observado tanto para a população do rio São Francisco como para a do rio Araguaia (Figura 1). Segmentos heterocromáticos intercalados ou adjacentes com os sítios ribossomais são freqüentes entre os peixes neotropicais, conforme verificado para as três populações analisadas, fato este que provavelmente possibilita a dispersão dos sítios de NORs pelo genoma (Vicari *et al.*, 2008). É notável a grande similaridade entre cromossomos submetacêntricos 17, 14 e 15, portadores de seqüências de rDNA 18S, entre as populações do rio São Francisco, Araguaia e Xingu, respectivamente, indicando a provável correspondência entre eles para esse marcador (Figura 3). Tais relações ressaltam que, apesar das divergências interpopulacionais existentes, alguns sítios mantêm-se conservados, possivelmente devido a algum papel particular desempenhado pelos mesmos. A presença de um sítio de NOR em apenas um dos homólogos do par 10 na população da bacia do Araguaia (Figura 2) pode ser devida a um heteromorfismo acentuado de tamanho. De fato, heteromorfismo de tamanho de NORs,

possivelmente decorrentes de crossing over desiguais, são comumente encontrados em peixes Neotropicais, o que pode eventualmente reduzir o tamanho de um dos sítios homólogos de forma drástica, inviabilizando a sua detecção por FISH.

NORs biteloméricas, ou seja, presentes em ambas as regiões teloméricas de um mesmo cromossomo, é uma característica recorrente nos diferentes cariomorfos de *H. malabaricus* (Bertollo, 1996; Vicari *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2009; Cioffi *et al.*, 2009), assim como em algumas outras espécies de peixes como *Pyrrhulina cf australis* (Oliveira *et al.*, 1991), *Poecilia latipunctata* (Galetti Jr. & Rash, 1993) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2005). Até o presente momento, não há registro de alguma população pertencente ao cariomorfo A de *H. malabaricus* que não apresentasse NORs biteloméricas, conforme verificado nas populações da bacia do rio Xingu e do rio Araguaia (Figura2). Entretanto, é notável a correspondência entre os pares cromossômicos metacêntricos 4 e 9 da população do rio Xingu e os pares 6 e 9 da população do São Francisco, apesar destes últimos apresentarem NORs biteloméricas (Figura 3).

O fóssil brasileiro do Mio-Plioceno (+*Paleohoplias assisbrasilensis*) pertencente à família Erythrinidae demonstra o quanto antigo é este grupo de peixes neotropicais (Gayet *et al.*, 2003), existindo há no mínimo cinco milhões de anos. Esta constatação, aliada a uma somatória de outras importantes características de *H. malabaricus* como (a) grande distribuição geográfica nas bacias hidrográficas sul-americanas (Bertollo *et al.*, 2000), (b) formação de isolados em uma mesma bacia hidrográfica através de acidentes geológicos (formação de cachoeiras, grandes corredeiras ou lagos), (c) características ecológicas favoráveis à dispersão (sobrevivência em condições adversas) e (d) fácil adaptação a novos ambientes (características fisiológicas e de predação) (Rantin *et al.*, 1992, 1993; Rios *et al.*, 2002; Azevedo & Gomes, 1943), pode explicar a grande diversidade cariotípica existente nesse grupo de peixes. Tais divergências são provavelmente oriundas de diferentes histórias evolutivas decorrentes dos isolamentos populacionais, a ponto dos cariomorfos de *H. malabaricus* poderem representar unidades

biológicas distintas. Por sua vez, os marcadores cromossômicos (clássicos e moleculares) utilizados no presente trabalho se mostraram adequados para a identificação da biodiversidade entre diferentes populações do cariomorfo A de *H. malabaricus*, corroborando dados obtidos com outros marcadores em outras populações desse mesmo cariomorfo (Born & Bertollo, 2001; Vicari *et al.*, 2005), reforçando assim a variação genética presente nesse grupo de nossa ictiofauna.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem o Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa (MZUSP) pela identificação dos exemplares, aos técnicos Pedro Luis Gallo e Luis Henrique da Silva (Piau) pelo auxílio nas coletas, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Licença número: 10538-1), ao Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) pela autorização de coleta do material e ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG) pelas sugestões e idéias. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Referências Bibliográficas**

- Azevedo, P. & Gomes, A.L. 1943. Contribuição ao estudo da biologia da Traíra *Hoplias malabarica* (Bloch, 1794). *Boletim de Indústria Animal*. Departamento da Produção Animal, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, São Paulo **5(4)**:15-64.
- 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. 1996. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* **61**:75-81.

- Bertollo, L.A.C., Fontes, M.S., Fenocchio, A.S. & Cano, J. 1997a. The  $X_1X_2Y$  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.C., Falcão, J.N. & Fenocchio, A.S. 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* **93**:228-233.
- Blanco, D.R., Lui, R.L., Bertollo, L.A.C., Diniz, D. & Moreira-Filho, O. 2009. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Rev. Fish Biol. Fisheries*, doi: 10.1007/s11160-009-9116-3
- 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.
- Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. 2001. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. *Genetica* **110**:1-9.
- Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. 2006. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J. Biol.* **66**:205-210.

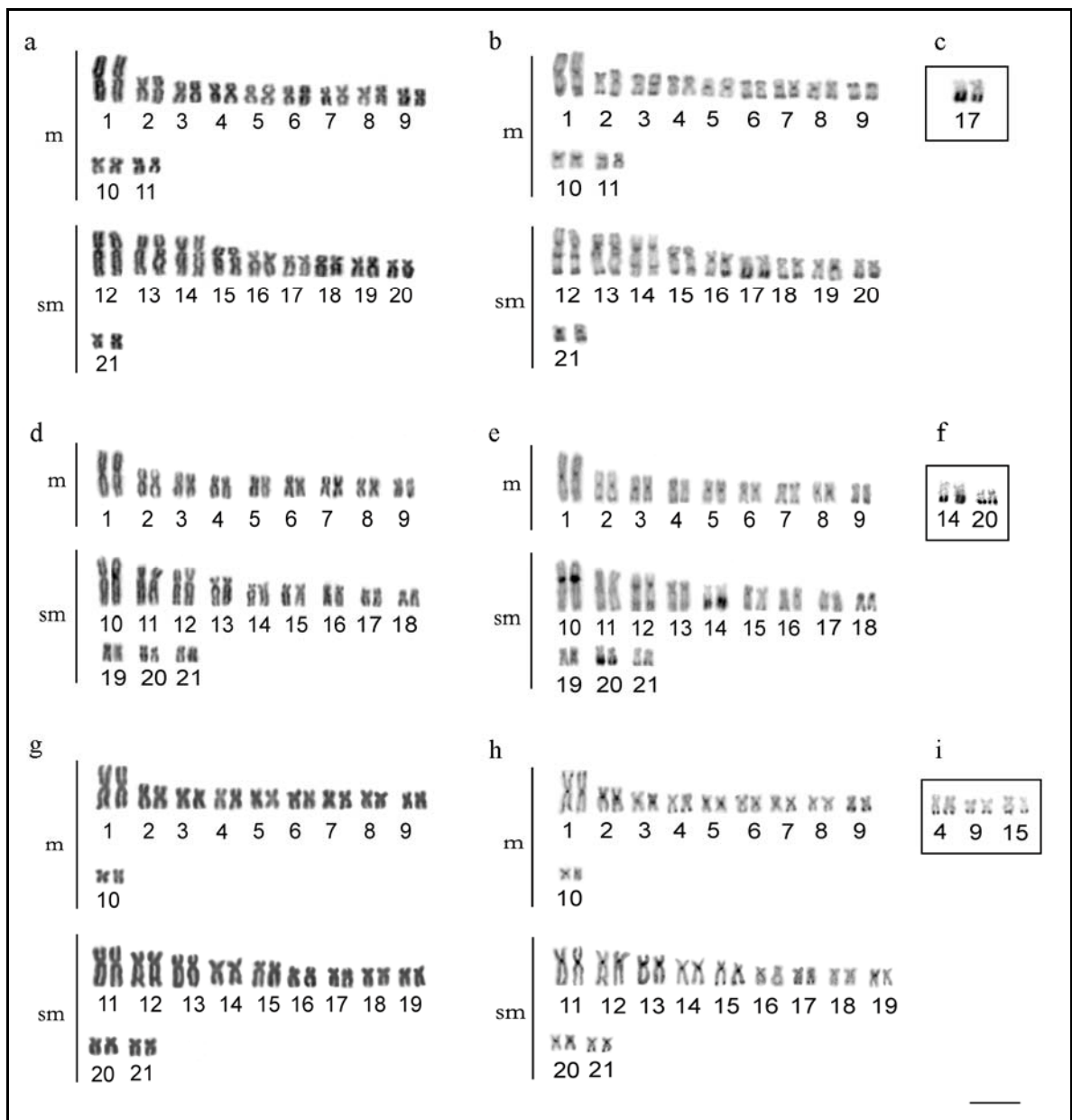
- Charlesworth, B., Snlegowski, P. & Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**:215-220.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U. & Bertollo, L.A.C. 2009. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogen. Genome Res.* doi:10.1159/000227838.
- 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.
- Dergam, J.A. 1996. Pylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Block, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex. PhD thesis. Colorado State University, USA.
- Diniz, D. & Bertollo, L.A.C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia* **56**:303-313.
- Ferreira, I.A., Bertollo, L.A.C. & Martins, C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. *Cytogenet. Genome Res.* **118**:78-83.
- Foresti, F., Oliveira, C. & Almeida-Toledo, L.F. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia* **49**:810-813.
- Galetti Jr, P.M. & Rash, E.M. 1993. NOR variability in diploid and triploid forms at the Amazon molly *Poecilia Formosa* as show by silver nitrate and chromomycin A3 staining. *Brazil J. Genet.* **16**:927-938.
- Galetti Jr, P.M., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. 1994. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia* **47(3-4)**:289-297.

- Gayet, M., Jégu, M., Bocquentin, J. & Negri, F.R. 2003. New characoids from the upper Cretaceous and Paleocene of Bolivia and the Mio-Pliocene of Brazil: phylogenetic position and paleobiogeographic implications. *J. Verteb. Paleont.* **23**:28-46.
- 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.
- Haaf, T., Schimid, M., Steinlein, C., Galetti Jr, P.M. & Willard, H.F. 1993. Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Res.* **1**:77-86.
- Heney, E., Kynard, B., Zhuang, P. 2002. Use of electronarcosis to immobilize juvenile lake and shortnose sturgeons for handling and the effects on their behavior. *J. Appl. Ichthyol.* **18**:502–504.
- Howell, W.M. & Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**:1014-1015.
- Lemos, P.M.M., Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. & Cestari, M.M. 2002. Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçú river basin (Paraná State, Brazil). *Caryologia* **55(3)**:193-198.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**:201-220.
- Lui, R.L., Blanco, D.R., Margarido, V.P. & Moreira-Filho, O. 2009. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron.* **40(5-6)**:552-559.
- Lopes, P.A. & Fenocchio, A.S. 1994. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). *Cytobios* **80**:217-221.

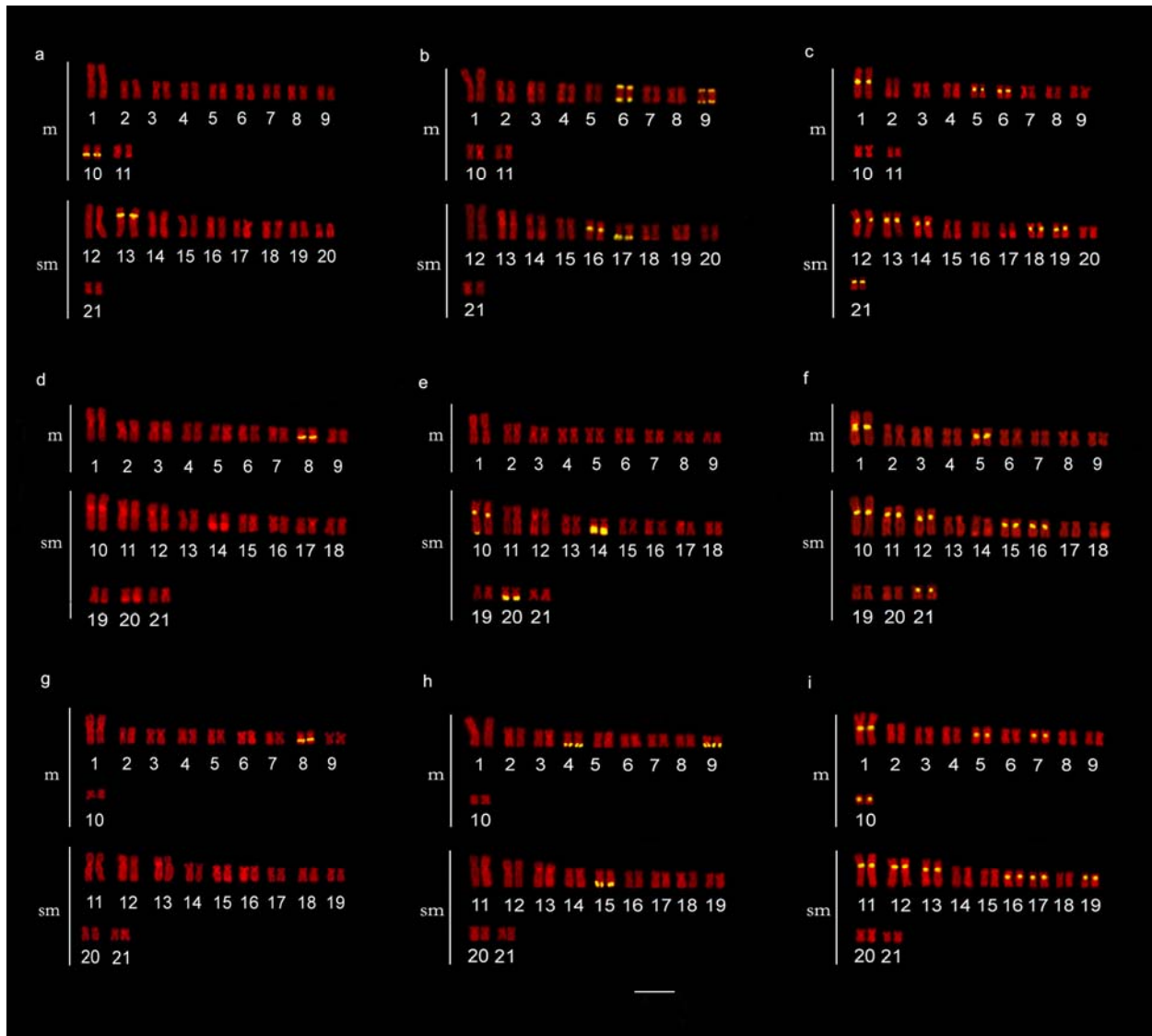
- Lopes, P.A., Alberdi, A.J., Dergan, J.A. & Fenocchio, A.S. 1998. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey river (Province of Corrientes, Argentina). *Copeia* **1998**:485-487.
- Mantovani, M., Abel, L.D.S. & Moreira-Filho, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genética* **123**:211-216.
- 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.
- Okada, E.K., Agostinho, A.A., Petrere Jr, M. & Penczak, T. 2003. Factors affecting fish diversity and abundance in drying ponds and lagoons in the upper Paraná River basin, Brazil. *Ecohydrology & Hydrobiology* **3(1)**:97-110.
- Oliveira, C., Andreato, A.A., Almeida-Toledo, L.F. & Toledo-Filho, S.A. 1991. Karyotype and nucleolus organizer regions *Pyrrhulina cf australis* (Pisces, Characiformes, Lebiasinidae). *Brazil J. Genet.* **14**:685-690.
- 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(2)**:117-140.
- Pazza, R. & Julio Jr, H.F. 2003. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river foodplain (Brazil). *Cytologia* **68(2)**:159-163.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **83**:2934-2938.
- Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Glass, M.L. & Fernandes, M.N. 1992. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish Biol.* **41**:805-812.

- Rantin, F.T., Glass, M.L., Kalinin, A.L., Verzola, R.M.M. & Fernandes, M.N. 1993. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. *Environmental Biology of Fishes* **36**:93-97.
- Rios, F.S., Kalinin, A.L. & Rantin, F.T. 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *J. Fish Biol.* **61**:85-95.
- Scavone, M.D.P., Bertollo, L.A.C. & Cavallini, M.M. 1994. Sympatric occurrence of two Karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, erythrinidae). *Cytobios* **80**:223-227.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**:304-306.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet. Genome Res.* **101**:24-28.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F. & Bertollo, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet. Mol. Biol.* **28**:103-110.
- Vicari, M.R., Pazza, R., Artoni, R.F., Margarido, V.P. & Bertollo, L.A.C. 2006. Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**(2):297-303.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. 2008. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*. *Cytogenet. Genome Res.* **122**:67-72.

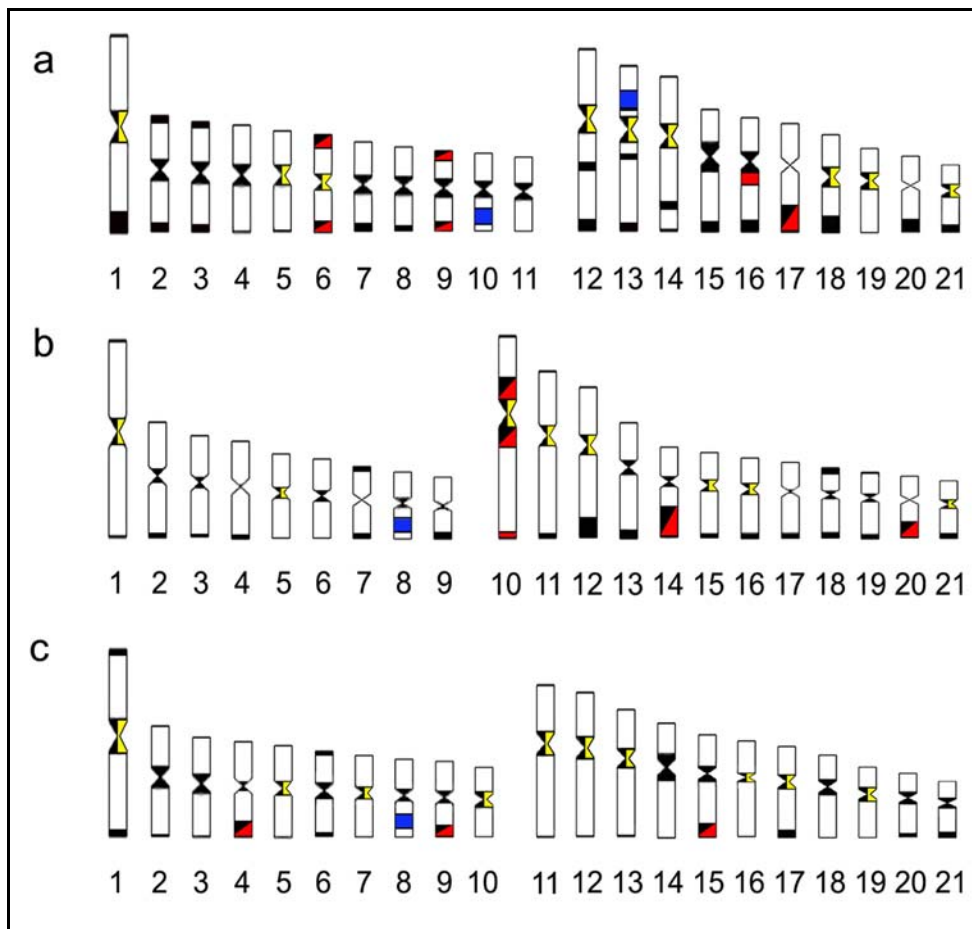




**Figura 1** – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo A) com coloração Giemsa convencional (a, d, g), com bandamento C (b, e, h) das populações das bacias do rio São Francisco (a, b), Araguaia (d, e) e Xingu (g, h). Nos boxes estão apresentados os cromossomos portadores de Ag-NORs nas populações do São Francisco (c), Araguaia (f) e Xingu (i). Barra = 5 μm.



**Figura 2** – Cariótipos de *Hoplias malabaricus* (cariomorfo A) com hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 5S (a, d, g), rDNA 18S (b, e, h) e DNA satélite 5SHindIII (c, f, i) das populações das bacias dos rios São Francisco (a, b, c), Araguaia (d, e, f) e Xingu (g, h, i). Barra = 5 μm.



**Figura 3** – Idiogramas referente às populações de *H. malabaricus* das bacias dos rios São Francisco (a), Araguaia (b) e Xingu (c), destacando os marcadores cromossômicos obtidos. Preto = heterocromatina C-positiva, azul = sítios de rDNA 5S, vermelho = sítios de rDNA 18S e amarelo = sítios do DNA satélite 5SHindIII.

**Tabela 1** – Dados citogenéticos referentes a populações do cariomorfo A de *Hoplias malabaricus*. AM = Estado do Amazonas, MT = Estado do Mato-Grosso, GO = Estado de Goiás, MG = Estado de Minas Gerais, SP = Estado de São Paulo, SC = Estado de Santa Catarina, RS = Estado do Rio Grande do Sul, PR = Estado do Paraná, m = metacêntrico, sm = submetacêntrico.

<b>Localidade</b>	<b>Fórmula Cariotípica</b>	<b>Referência</b>
Manaus (AM) - Igarapé Mindu	24m + 18sm	Bertollo et al. (2000), Born e Bertollo (2001)
Poconé (MT) - rio Bento Gomes	////////	Bertollo et al. (2000)
Araguaiana (MT) - córrego Dois de Agosto	20m + 22sm	Bertollo et al. (2000), Born e Bertollo (2001)
São Miguel do Araguaia (GO) - córrego do Medo	18m + 24sm	Presente trabalho
Três Marias (MG) - rio São Francisco	////////	Bertollo et al. (2000)
Reserva Ecológica do Jataí (SP) - rio Mogi-Guaçu	////////	Scavone et al. (1994)
S.J. do Marinheiro (SP) - Água Vermelha: rio Grande	////////	Bertollo et al. (2000)
Conceição das Alagoas (MG) - Reservatório de Volta Grande	////////	Dregan (1996)
Represa de Furnas (MG) - rio Grande	22m + 20sm	Blanco et al (2009)
Piumhi (MG) - São Francisco	22m + 20sm	Blanco et al. (2009), Presente trabalho
Juquiá (SP) - rio Juquiá	////////	Bertollo et al. (2000)
Itatinga, Avaré (SP) - reservatório Jurumirim: rio Paranapanema	24m + 18sm	Bertollo et al. (2000), Born e Bertollo (2001)
Descalvado (SP) - rio Pântano	22m + 20sm	Cioffi et al. (2009)
Palmeiras (PR) - Rio Iguazu	24m + 18sm	Vicari et al. (2003, 2005, 2006)
Poço Preto (SC) - rio Iguazu	////////	Bertollo et al. (2000)
Guaíba (RS) - rio Guaíba	////////	Bertollo et al. (2000)
Canarana (MT) - rio Sete de Setembro	20m + 22sm	Presente trabalho
Santo Antônio do Legever (MT) - rio Cuiabá	22m + 20sm	Cioffi et al. (2009)
Corrientes - Argentina - rio Aguapey	////////	Lopes e Fenocchio (1994) e Lopes et al. (1998)
Tacuarembó - Uruguai - rio Negro	////////	Dergan (não publicado)
Ponta Grossa (PR) - rio Tibagi	24m + 18sm	Vicari et al. (2005)
Ivaí (PR) - rio Ivaí	24m + 18sm	Vicari et al. (2005)
Castro (PR) - rio Ribeira	24m + 18sm	Vicari et al. (2005)
Pariquera-Açu (SP) - rio Ribeira	24m + 18sm	Vicari et al. (2005)
Rio Grande (RS) - córrego Bolaxa	22m + 20sm	Born e Bertollo (2001)
São Carlos (SP) fazenda Guaporé	20m + 22sm	Born e Bertollo (2001)
Passos (MG) - rio Grande	22m + 20sm	Born e Bertollo (2001)

Porto Rico (PR) - Alto rio Paraná	24m + 18sm	Pazza e Júlio Jr (2003)
Nova Prata do Iguaçu (PR) - rio Iguaçu	24m + 18sm	Vicari et al. (2006)
Botucatu (SP) - rio Aquará	////////	Martins et al. (2006), Ferreira et al. (2007)
Parque Florestal do Rio Doce (MG) - Lagoa rio Doce	22m + 20sm	Born e Bertollo (2006), Cioffi et al. (2009)
Piraquara (PR) - fazenda Canquiri, rio Iguaçu	20m + 22sm	Lemos et al. (2002)

## **CAPÍTULO III**

**CONSERVAÇÃO DA MACROESTRUTURA CARIOTÍPICA NAS  
ESPÉCIES DE TRAIRÕES E O PAPEL DOS DNAs REPETITIVOS NA  
DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *H. aimara* e *H. intermedius*  
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).**

**Artigo em preparação**

## Resumo

Duas espécies de traíróes: *H. intermedius* provenientes da bacia do rio São Francisco e *H. aimara*, da bacia do rio Arinos (Amazônica) foram caracterizados através de metodologias de citogenética clássica e molecular. As espécies apresentaram uma conservação na macroestrutura cariotípica, fato incomum entre os demais eritrinídeos. Em contrapartida, a coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>, DAPI) e o mapeamento físico de seqüências repetitivas através de hibridizações *in situ*, evidenciou uma grande diversidade inter-específica que, por processos microevolutivos, principalmente relacionados à essa fração repetitiva do genoma, possibilita um aumento da variabilidade genética entre as espécies, além de corroborar com a separação taxonômica das mesmas.

**Palavras-Chave:** Grupo *H. lacerdae*, Cot-1 DNA, diversidade cariotípica, citotaxonomia.

## Introdução

A família Erythrinidae é composta segundo Azevedo & Gomes (1943) por três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. Embora amplamente distribuídos pelo continente Sul-Americano, *Hoplias* é o mais difundido desses gêneros. Para a região Sudeste do Brasil são considerados dois grandes grupos, *H. malabaricus* e *H. lacerdae*, conhecidos popularmente como traíras e traíróes, respectivamente. Uma diferença morfológica marcante entre esses grupos está presente na região gular, uma vez que as bordas dos dentários são convergentes nas traíras, encontrando-se na região anterior, sendo paralelas nos traíróes.

Oyakawa & Mattox. (2009), reconheceram seis espécies válidas no grupo *H. lacerdae*, ou seja, *H. brasiliensis* (Bahia), *H. aimara* (bacia Amazônica), *H. currupira* (região de Manaus), *H. intermedius* (bacias do rio São Francisco e Grande), *H. australis* (região Sul) e *H. lacerdae*

(bacia do Ribeira de Iguape). Especificamente em relação a *H. intermedius* (citado como grupo *H. lacerdae*), foi constatado que esta espécie pode ser encontrada em condições ambientais muito mais rígidas do que os demais erithrinídeos, visto que estes ocorrem preferencialmente em riachos ou na calha principal dos rios, onde a oxigenação da água é alta. (Blanco *et al.*, 2010).

Os trairões apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada quando comparados com espécimes do grupo *H. malabaricus*, com um número diplóide igual a cinquenta cromossomos ( $2n=50$ ), sem a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos. Morelli *et al.* (2007) ampliaram o conhecimento citogenético desse grupo, ao estudarem amostras de distintas populações naturais, bem como de ambientes de cultivo, não encontrando diferenças cariotípicas significativas entre elas, reforçando a relativa homogeneidade cariotípica desse grupo quando comparado com o grupo *H. malabaricus*.

Diversos marcadores cromossômicos como a fórmula cariotípica, padrões de bandamentos, mapeamento de sítios de DNAs repetitivos são ferramentas citotaxonômicas importantes, úteis na identificação e na validação de diversas espécies. Por exemplo, *Parodon nasus* e *Parodon tortuosus*, duas espécies da família Parodontidae, inicialmente consideradas espécies distintas, foram posteriormente colocadas em sinonímia, o que foi plenamente corroborado por marcadores citogenéticos (Bellafronte *et al.*, 2005). Em contrapartida, esses marcadores também corroboraram a separação das espécies *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus carapo*, da família Gymnotidae (Bellafronte, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo a análise cariotípica e a busca de marcadores cromossômicos em *H. intermedius* e *H. aimara*, duas espécies do grupo *H. lacerdae*, procurando evidências adicionais sobre a evolução cariotípica nesse grupo da família Erythrinidae.



## **Materiais e Métodos**

Nove espécimes (sete machos e duas fêmeas) de *H. aimara* provenientes de afluentes do rio Arinos – MT (bacia Amazônica) e nove espécimes de *H. intermedius* (seis machos e três fêmeas) provenientes do ribeirão das Araras – MG (bacia do rio São Francisco) foram caracterizados por metodologias de citogenética clássica e molecular.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior (Bertollo *et al.* 1978; Foresti *et al.* 1993) e classificados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), de acordo com a relação de braços (Levan *et al.* 1964). A distribuição da heterocromatina C-positiva foi analisada conforme Sumner (1972), com algumas modificações (Lui *et al.* 2009) e as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs) foram obtidas conforme Howell & Black (1980). A ocorrência de sítios cromossômicos ricos em GC ou AT foram evidenciadas pelos fluorocromos base-específicos Cromomicina A<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente, segundo Schmid (1980). Hibridações *in situ* fluorescentes (FISH) foram desenvolvidas conforme Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de rDNA 18S (Hatanaka & Galetti Jr 2004), rDNA 5S (Martins & Galetti Jr 1999) e fração de DNA repetitivos de ambas as espécies obtidas a partir da cinética de reassociação baseado no DNA Cot-1. A fração do DNA repetitivo Cot-1 foi obtido conforme Wei *et al.* (2005) e adaptações propostas por Vicari *et al.* (*in press*). As sondas de rDNA 18S e fração de DNA repetitivo Cot-1 de *H. intermedius* (aqui denominada de sonda Cot total *intermedius*) foram marcadas com biotina-16-dUTP por *nick translation* segundo as instruções do fabricante (Biotin Nick Translation mix – Roche). Por sua vez, as sondas de rDNA 5S e fração de DNA repetitivo Cot-1 de *H. aimara* (aqui denominada de sonda Cot total *aimara*) foram marcadas por *nick translation* com digoxigenina 11- dUTP segundo as instruções do fabricante (Dig Nick translation mix – Roche). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX50. Para a captura das imagens foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 6.3 (Media Cybernetics).

## Resultados

Em ambas as espécies, a clivagem do DNA total resultou em bandas de 100-2000 pb, enquanto a fração DNA *Cot*-1, tanto de *H. aimara* e *H. intermedius* (passível de hibridização), resultou em fragmentos variando de 100-200 pb (Fig.1)

### *Hoplias intermedius*

Os exemplares de *H. intermedius* apresentaram  $2n=50$  cromossomos (20m + 30sm), NF=100, tanto em machos como em fêmeas, sem cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 2a). O bandamento C evidenciou heterocromatina localizada preferencialmente em regiões pericentroméricas de quase todos os cromossomos, juntamente com algumas bandas em posição terminal (Fig.2b). A coloração com nitrato de prata evidenciou apenas um único par de regiões organizadoras do nucléolo ativas (Ag-NORs), situadas intersticialmente nos braços longos do par submetacêntrico nº 17, na região proximal (Fig.2, *in box*). A coloração com CMA<sub>3</sub> identificou oito grandes sítios cromossômicos positivos, ricos em pares de bases GC, na região proximal ao centrômero, os quais correspondem a sítios negativos na coloração com DAPI (Fig.3). A hibridização *in situ* evidenciou sítios de rDNA 5S na região proximal nos braços longos do par submetacêntrico nº 19. Apenas o par cromossômico nº 17 apresentou sítios de rDNA 18S, localizados na região correspondente às Ag-NORs (Fig.4). A FISH com sonda *Cot* total *intermedius* evidenciou sítios fortemente marcados na região centromérica de praticamente todos os cromossomos, com exceção dos pares 18 e 20 que apresentaram sinal quase inexistente. Em contrapartida, a FISH com sonda *Cot* total *aimara* não evidenciou nenhum sinal positivo nos cromossomos de *H. intermedius* (Fig.5).

## ***Hoplias aimara***

O número diplóide encontrado para os exemplares de *H. aimara* foi de 50 cromossomos (20m + 30 sm), igualmente sem sistema de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 2a). A heterocromatina também se mostrou preferencialmente localizada na posição pericentromérica de quase todos os pares cromossômicos, sendo que alguns pares (principalmente o primeiro par submetacêntrico) apresentaram bandas pálidas na região terminal do braço longo (Fig. 2b). Somente um sítio de Ag-NOR foi constatado, na posição pericentromérica do par submetacêntrico nº 13 (Fig.2, *in box*). A coloração com fluorocromo base-específico CMA<sub>3</sub> evidenciou somente um sítio positivo, GC rico, na região pericentromérica de um cromossomo metacêntrico pequeno (par 4), o qual se apresentou negativamente corado por DAPI (Fig.3). A FISH com sonda de rDNA 18S evidenciou, além do sítio de NOR mostrado pela prata, um sítio adicional na posição pericentromérica de um metacêntrico pequeno (par 4), correspondente ao sítio GC-rico ali localizado. A hibridização com sonda de rDNA 5S evidenciou somente um sítio localizado na região pericentromérica do par cromossômico 20 (Fig.4). A FISH com sonda *Cot* total *aimara* evidenciou marcações na região pericentromérica dos pares metacêntricos 1, 3, 4, 5, 9, 10 e submetacêntricos 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18. A FISH com sonda *Cot* total *intermedius* evidenciou 14 marcações em regiões pericentroméricas dos pares cromossômicos 1, 3, 4, 5, 9, 10 e 16. A dupla FISH com sonda *Cot* total *intermedius* e *Cot* total *aimara* evidenciou que esses sítios são co-localizados nos pares 1, 3, 4, 9, e 10, enquanto que os pares 6 e 16 apresentam apenas sinais *Cot* total *intermedius* e os pares cromossômicos 5, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18 apresentam apenas sinais *Cot* total *aimara* (Fig.5).

## **Discussão**

As duas espécies estudadas, *H. intermedius* e *H. aimara*, apresentaram 2n=50 cromossomos, tanto em machos quanto em fêmeas, sem a presença de cromossomos sexuais

heteromórficos (Fig.2a), mostrando uma conservação na macroestrutura cariotípica, conforme já observado para outras espécies/populações do grupo *H. lacerdae*, corroborando assim os resultados anteriormente obtidos (Morelli et al., 2007). Entretanto, algumas diferenças específicas podem ser também observadas em relação aos cromossomos dos primeiros pares metacêntricos e submetacêntricos de ambas as espécies. Em *H. intermedius* o par 1 é consideravelmente maior quando comparado com o par nº 2, porém em *H. aimara* essa diferença de tamanho não foi observada. Em contrapartida, há uma homogeneidade mais acentuada com relação aos primeiros pares submetacêntricos (pares 11 e 12) em *H. intermedius* já em *H. aimara* o par nº 11 apresenta-se bem maior do que o subsequente par 12.

As Ag-NORs não se mostraram bons marcadores específicos em relação ao número e sua posição, uma vez que nas duas espécies, apenas um sítio foi identificado na posição proximal no braço longo do cromossomo portador. Contudo, a distribuição deste sítio mostrou-se distinta entre as duas espécies, ocorrendo no par 17 em *H. intermedius* e no par 13 em *H. aimara*. Entretanto, é possível que esta diferença seja apenas consequência do arranjo dos cromossomos nos cariótipos, visto que os dois pares cromossômicos são bastante similares, tanto em relação ao tamanho, morfologia e posição das Ag-RONs. (Fig. 2, *in box*).

Por outro lado, a distribuição dos sítios de rDNA 18S se mostrou um marcador citotaxonômico bem mais específico. De fato, *H. intermedius* apresentou somente um par cromossômico portador desse marcador coincidente com a Ag-NOR, enquanto que *H. aimara* apresentou dois pares de cromossomos portadores dessa classe de DNA, um deles também coincidente com a Ag-NOR e o outro localizado em um metacêntrico pequeno (Fig.4). Segundo Almeida-Toledo & Foresti (1985) o caráter NOR simples pode ser considerado ancestral em relação às NORs múltiplas nos peixes Neotropicais, o que conferiria à *H. aimara* uma condição mais derivada em relação a essa característica.

Em ambas as espécies a heterocromatina C-positiva mostrou-se alocada preferencialmente na posição pericentromérica. Entretanto, em *H. intermedius* são bem evidenciados alguns blocos heterocromáticos conspícuos, não observados no cariótipo de *H. aimara*. Caracteristicamente, todos esses sítios mostraram-se GC-ricos, ou seja, positivos após a coloração com CMA<sub>3</sub>, corroborando os dados anteriormente obtidos por Morelli *et al.* (2007). Assim sendo, em *H. intermedius* podem ser destacadas duas classes distintas de heterocromatina: uma GC-rica, exclusiva desses sítios heterocromáticos conspícuos e a outra que não se destaca após a coloração com a CMA<sub>3</sub>, pericentromérica, encontrada na maioria dos cromossomos. É pertinente ressaltar que em *H. malabaricus*, do rio Iguaçu, foi também observada a ocorrência das duas classes de heterocromatina (Vicari *et al.*, 2006), indicando ser uma característica que pode estar difundida entre distintas espécies do gênero *Hoplias*. Já é conhecido que regiões organizadoras de nucléolo GC-ricas são comumente encontradas em peixes (Mayr *et al.* 1985; Schmid & Guttenbach 1988; Phillips & Hartley, 1988; Sola *et al.*, 1992, Vicari *et al.*, 2006; Lui *et al.*, 2009). De fato, em *H. intermedius* o sítio de Ag-NOR é também GC-rico. Entretanto, curiosamente, em *H. aimara* o único sítio CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (GC-rico) é o correspondente ao sítio adicional e não ativo de rDNA 18S. Desta forma, a coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina A<sub>3</sub> evidenciou-se um excelente marcador cromossômico para *H. intermedius* e *H. aimara*, visto que o número de sítios GC-ricos e suas eventuais correspondências com NORs são diferenciais para cada uma dessas espécies (Fig.3).

A localização do rDNA 5S vem se mostrando bastante conservada na maioria das famílias de peixes Neotropicais. Porém, em algumas famílias este marcador se apresenta variável sendo, desta forma, importante em estudos de evolução cromossômica. Assim, por exemplo, entre os peixes eritrídeos os sítios de rDNA 5S apresentam variação dentro e entre cariomorfos do grupo *H. malabaricus* (Ferreira *et al.* 2007, Cioffi *et al.* 2009, Blanco *et al.* 2010), como também entre populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Diniz & Bertollo 2003). Em

contrapartida, nas duas espécies ora estudadas esses sítios encontram-se presentes em pares de cromossomos correspondentes e, praticamente, na mesma posição (Fig.4).

É sabido que os DNA satélites apresentam uma grande dinâmica evolutiva (Wichman *et al.*, 1991) e que sua mobilidade, amplificação e potencial para acumular mutações exercem um importante papel na evolução cariotípica, principalmente quando essas seqüências são espécie específicas e/ou cromossomo específicas (Ugarkovic & Plohl, 2002), sendo importantes ferramentas em estudos microevolutivos e filogenéticos (Pons *et al.*, 2002; Pons & Gillespie, 2003; Kantek *et al.*, 2009). A FISH com ambas as sondas de Cot-1 DNA revelou que essas frações repetitivas apresentam-se alocadas preferencialmente na região centromérica dos cromossomos, em ambas as espécies. A hibridização *in situ* com sonda de DNA Cot total *intermedius* apresentou marcação em quase todos os cromossomos desta mesma espécie. Alguns poucos cromossomos apresentaram-se marcados quando foi realizada a hibridização cruzada desta sonda em *H. aimara*. Por sua vez, a FISH com sonda de DNA Cot total *aimara* também evidenciou marcações centroméricas em quase todos os cromossomos desta espécie. Entretanto, a hibridização cruzada em *H. intermedius* não evidenciou nenhum sítio detectável pela FISH (Fig.5). É provável que a fração repetitiva que é exclusiva do genoma de *H. aimara*, que pode ter surgido pelo acúmulo de mutações no DNA repetitivo, possa corresponder a um caráter apomórfico dessa espécie. Desta forma, *H. intermedius* poderia estar mantendo fixada em seu genoma uma fração repetitiva mais próxima àquela do seu ancestral, a qual estaria presente, numa menor escala, no genoma de *H. aimara*.

Segundo Potter (1997), uma bacia nunca terá uma exata datação, pois diferentes trechos de um rio pertencente a essa bacia provavelmente tenham idades distintas. Segundo o mesmo autor, a datação de um rio pode estar relacionada ao último grande evento tectônico ou glacial que ocorreu no sistema de drenagem no qual ele está inserido. A bacia Amazônica e a do São Francisco estão situadas sobre regiões cratônicas, ou seja, sobre porções antigas da crosta

continental que se mantiveram relativamente estáveis, sofrendo pouca ação dos processos tectônicos ao longo da formação dos continentes (Ribeiro, 2006; Alkimim, 2004). A colisão do cráton amazônico com o restante do Brasil originou uma cadeia montanhosa mais nova do que as do cráton de São Francisco (Cordani *et al.*, 2000). Assim, considerando que tais formações rochosas são as responsáveis pela formação das nascentes da maioria dos rios brasileiros, podemos considerar que a bacia Amazônica apresenta uma origem mais recente quando comparada com a bacia do São Francisco. O fato de que *H. aimara* se encontra distribuída na bacia Amazônica, enquanto *H. intermedius* se encontra na drenagem do rio São Francisco/Alto Paraná, confirma a hipótese anteriormente proposta de que alguns marcadores citogenéticos de *H. aimara*, principalmente os relacionados à fração repetitiva do genoma, sejam considerados derivados quando comparados com os de *H. intermedius*. Considerando que as bacias do rio São Francisco e Amazônica apresentam uma evolução tectônica distinta e intrínseca, provavelmente houve a possibilidade da divergência dessas espécies por alopatria. Desta forma, a análise dessa fração repetitiva do genoma corrobora com a identificação dessas espécies embasada em caracteres morfológicos.

Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com as considerações de Morelli *et al.* (2007), sugerindo que a conservação na macroestrutura cariotípica do grupo *H. lacerdae* vai de confronto com o caminho evolutivo seguido pelas outras espécies e gêneros de Erythrinidae onde, via de regra, é constatada uma grande diversidade cariotípica, mesmo em nível de análises cromossômicas clássicas, como exemplificado em *H. malabaricus* (Bertollo *et al.* 2000), em *Hoplerythrinus unitaeniatus*, (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988; Diniz & Bertollo, 2003) e em *Erythrinus erythrinus* (Bertollo *et al.*, 2004). Considerando a conservação cromossômica dos traíões e o seu número diplóide mais elevado, comparativamente à grande diversidade cromossômica e ao número diplóide menor presente no grupo *H. malabaricus*, o grupo *H. lacerdae* pode provavelmente representar um grupo mais basal dentro do gênero *Hoplis*.

Apesar de uma macroestrutura cariotípica conservada, a utilização de metodologias de citogenética molecular, como a coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>, DAPI) e o mapeamento físico de seqüências repetitivas através de FISH (rDNA 18S e Cot-1 DNA), evidenciou a diversidade presente em *H. intermedius* e *H. aimara*. Assim sendo, a homogeneidade macroestrutural estaria sendo contornada por processos microevolutivos, principalmente relacionados à fração repetitiva do genoma que parece escapar da pressão seletiva que age na fração restante do genoma, possibilitando um aumento da variabilidade genética entre as espécies.

## Referências Bibliográficas

- ALKMIM, F.F. (2004). O que faz de um cráton um cráton? O Cráton do São Francisco e as revelações Almeidianas ao delimitá-lo. IN: Mantesso Neto V., Bartorelli, A., Carneiro C.D.R., Brito-Neves B.B. orgs. 2004. Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida. Sao Paulo: Ed. Beca. 674p.
- ALMEDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. (1985) As regiões organizadoras do nucléolo em Peixes. *Ciência e Cultura*. 37(3): 448-453
- AZEVEDO, P.; GOMES, A.L. (1943). Contribuição ao estudo da Traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *Boletim de Indústria Animal*, 5: 15-64.
- BELLAFRONTE, E (2009). Citogenética Clássica e Molecular em peixes Neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas, com ênfase em região de transposição de rio. Dissertação de Mestrado. PPGGEv, UFSCar, São Carlos – SP.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. (2005). Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Gen. Mol. Biol.*, 28(4):710-716.

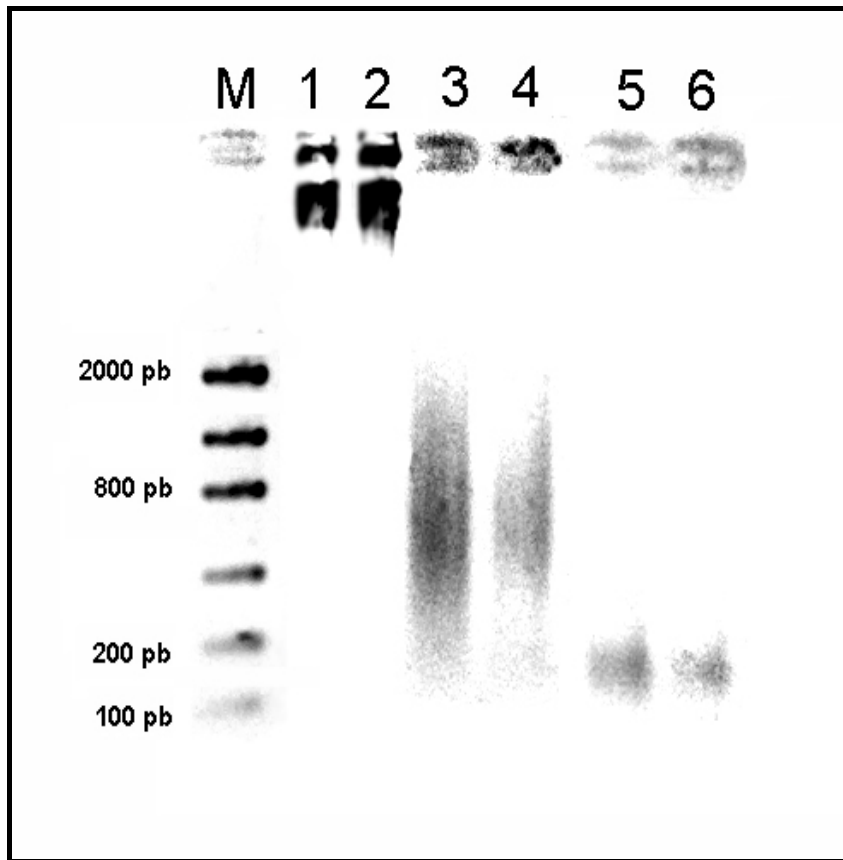


- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazil. J. Genet. 2: 103-120.
- BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chrom. Res. 8: 603-613.
- BERTOLLO, L.A.C.; OLIVEIRA, C.; MOLINA, W.F.; MARGARIDO, V.P.; FONTES, M.S.; PASTORI, M.C.; FALCÃO, J.N.; FENOCCHIO, A.S. (2004). Chromosome evolution in the eruthrinidae fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). Heredity 93:228-233.
- BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; BERTOLLO, L.A.C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. (2010). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). Rev. Fish Biol. Fisheries, doi: 10.1007/s11160-009-9116-3
- CIOFFI, M.B.; MARTINS, C.; CENTOFANTE, L.; JACOBINA, U.; BERTOLLO, L.A.C. (2009). Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. Cytogen Gen Res. doi: 10.1159/000227838.
- CORDANI, U.G.; MILANI, E.J.; THOMAZ FILHO, A.; CAMPOS, D.A. (2000). Tectonic Evolution of South America. Rio de Janeiro: 31° Internacional Geological Congress, 856 p.
- DINIZ, D.; BERTOLLO, L.A.C. (2003). Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. Caryologia 56:303-313.
- FERREIRA, I.A.; BERTOLLO, L.A.C.; MARTINS, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. Cytogenet Genome Res 118:78-83.

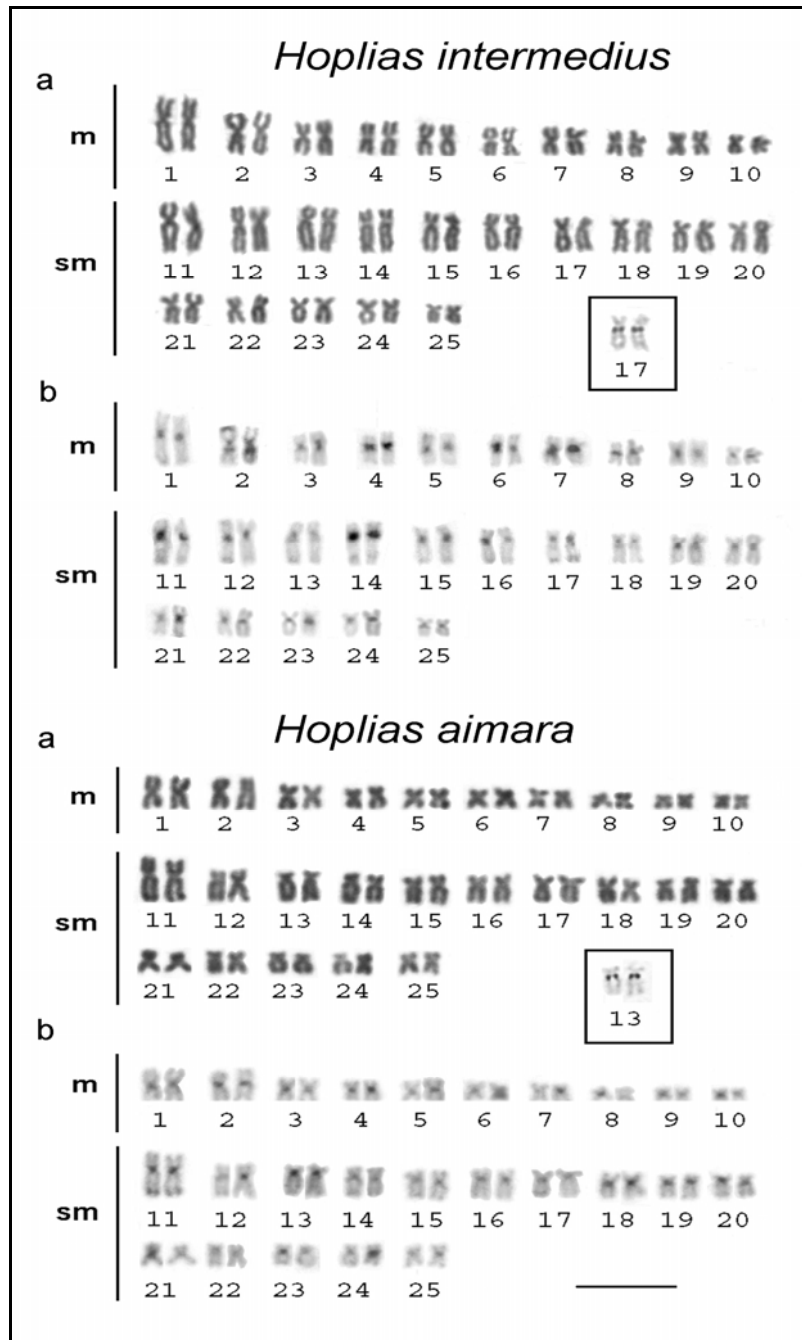
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with colchicine. *Experientia*. 49: 810-813.
- GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L.A.C. (1988). Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). *Brazil. J. Genet.* 11:299-306.
- HATANAKA, T.; GALETTI JR., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015
- KANTEK, D.L.Z.; VICARI, M.R.; PERES, W.A.M.; CESTARI, M.M.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. (2009). Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae 1 sedis). *Journal of Fish Biology* 74, doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40(5-6): 552-559.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7: 363-367
- MAYR, B.; KALAT, M.; RÀB, P. (1985). Localization of NORs and counter-stain-enhanced fluorescent studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica*, 67:51-56.

- MORELLI, S.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. (2007). Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Braz. J. Biol.* 67(Suppl.): 897-903
- 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(2):117-140.
- PHILLIPS, R.; HARTLEY, S.E. (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome* 30:51-56.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 83: 2934-2938
- PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. (2002). Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Mol. Biol. Evol.* 19:1329-1340.
- PONS, J.; GILLESPIE, R.G. (2003). Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: Evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. *Gene* 313:169-177.
- POTTER, P.E. (1997). The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a Natural History. *Journal of South American Earth Sciences*, 10, 331-344.
- RIBEIRO, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop Ichthyol.* 4, 225-246.
- SCHMID, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in *Anura*. *Chromosoma* 7: 83-103
- SCHIMIS, M.; GUTTENBACH, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97:101-114.

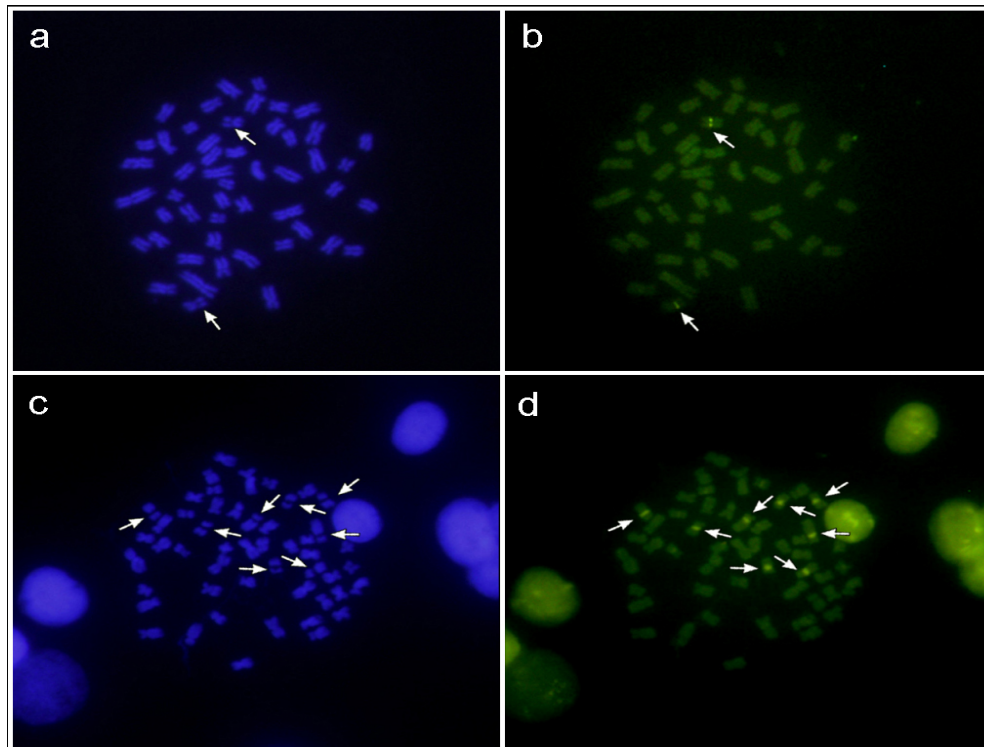
- SOLA, L.; ROSSI, A.R.; IASELLI, V, V.; RASH, E.M.; MÔNACO, P.J. (1992). Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*.II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromimycin A3 and silver staining. *Cytogenetic and Cell Genetics* 60: 229-235.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304-306.
- UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The Embo Journal* 21:5955-5959.
- VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R.B.; CESTARI, M.M.; CIOFFI, M.B.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. (*in press*). Satellite DNA in neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J. Fish Biol.*
- VICARI, M.R.; PAZZA, R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; BERTOLLO, L.A.C. (2006). Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú river. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(2):297-303.
- WEI, W.H.; ZHAO, W.P.; WANG, L.J.; CHEN, B.; LI, Y.C.; SONG, Y.C. (2005). Karyotyping of *Brassica napus* L. based on Cot-1 DNA banding by fluorescence in situ hybridization. *J. Integ. Plant. Biol.* 47:1479-1484.
- WICHMAN, H.A.; PAYNE, C.T.; RYDER, O.A.; HAMILTON, M.J.; MALTBIE, M.; BAKER, R.J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *Journal of Heredity* 82:369-377.



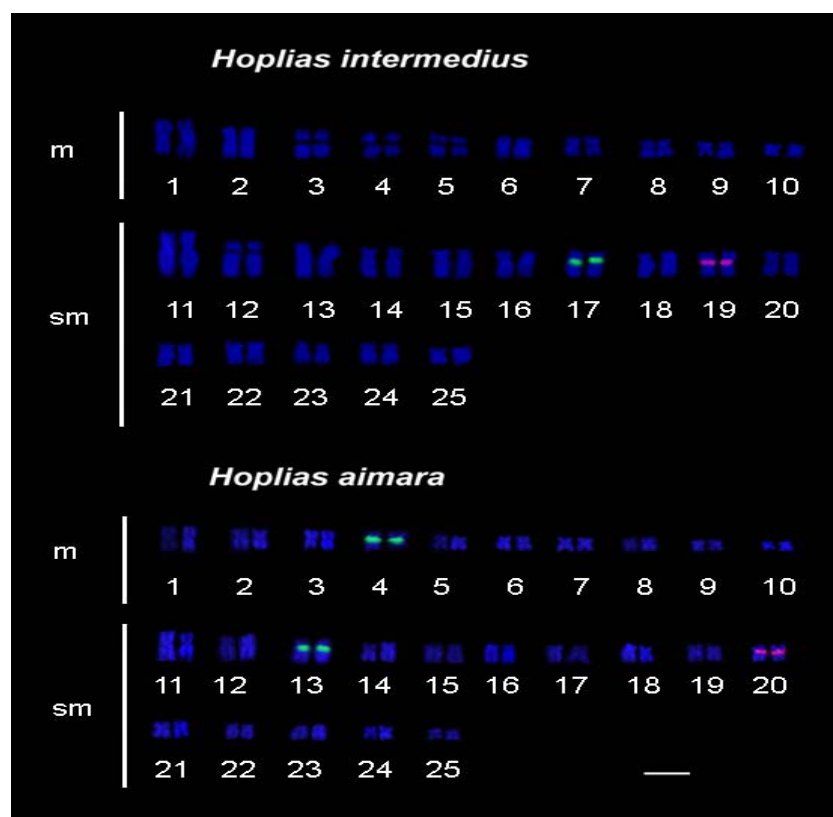
**Figura 1.** Obtenção do DNA Cot-1 de *H. aimara* e *H. intermedius*. (M) Marcador *Low mass*; (1) DNA genômico de *H. intermedius* e (2) de *H. aimara*.; (3) DNA genômico de *H. intermedius* e (4) de *H. aimara* após serem autoclavados por 5 minutos; (5) DNA Cot-1 de *H. intermedius* e (6) de *H. aimara*.



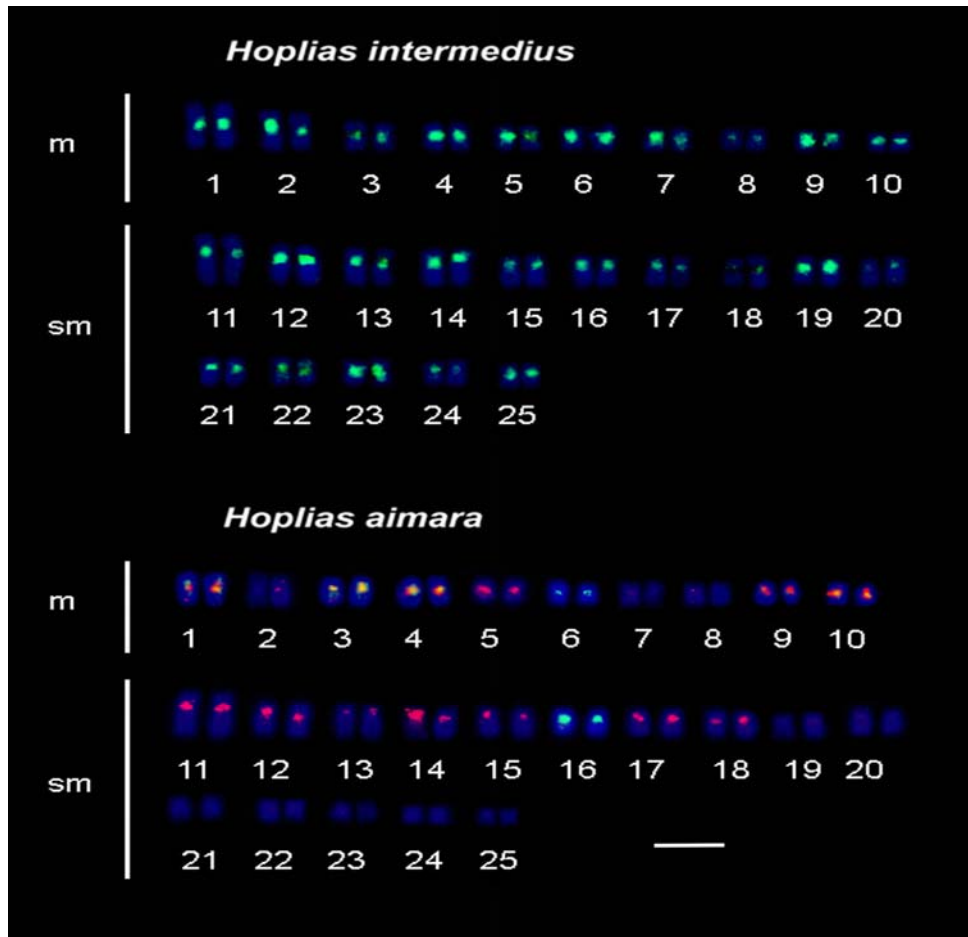
**Figura 2.** Cariótipos das espécies analisadas. (a) Coloração convencional por Giemsa, (b) Bandamento C e Ag-NOR in Box. Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 3.** Metáfases de *H. aimara* (a, b) e *H. intermedius* (c, d). Coloração com fluorocromo DAPI (a, c) e CMA<sub>3</sub> (b, d). As setas indicam sítos CG ricos em (b) e (d), confirmados negativamente em (a) e (c).



**Figura 4.** Cariótipo de *Hoplias intermedius* e *Hoplias aimara* após hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S (sinal verde) e rDNA 5S (sinal vermelho). Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 5.** Cariótipo de *Hoplias intermedius* e *Hoplias aimara* após hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNA Cot-1 *intermedius* (sinal verde) e DNA Cot-1 *aimara* (sinal vermelho). Os sinais amarelos correspondem a regiões que apresentam sobreposição das duas frações repetitivas (pares 1, 3, 4, 9 e 10). Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, diferentes populações de peixes do gênero *Hoplias*, provenientes das bacias dos rios São Francisco, Alto Paraná, Araguaia/Tocantins e Xingu, foram caracterizadas por metodologias de citogenética clássica (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e coloração com nitrato de prata – Ag-NOR) e molecular (dupla coloração com fluorocromos base-específicos: CMA3/DAPI e hidridização *in situ* com sondas de rDNA 5S, rDNA 18S e DNA satélite 5S*Hind*III e DNA Cot-1). Considerando os dados obtidos, é possível delinear algumas considerações sobre a distribuição, diversidade e evolução cariotípica nos grupos *H. malabaricus* e *H. lacerdae*.

Na região de transposição do rio Piumhi, da bacia do Alto Paraná para a bacia do São Francisco (MG), foram analisadas oito populações do grupo *H. malabaricus*, todas pertencentes ao cariomorfo A ( $2n=42$  cromossomos). Em contrapartida, todos os exemplares analisados da região de Três Marias, foram pertencentes ao cariomorfo F ( $2n=40$  cromossomos). Ao que tudo indica o cariomorfo A, predominante na bacia do Alto Paraná, pode representar uma forma invasora da bacia do rio São Francisco, via transposição. Por sua vez, conexões naturais como o antigo Pantanal do Cururu, podem ter também permitido o fluxo de peixes entre essas duas bacias. Tais conexões poderiam explicar a similaridade citogenética detectada entre os exemplares de *H. intermedius* (grupo *H. lacerdae*) coletados nas bacias do Alto Paraná e do São Francisco.

Com os dados apresentados do gênero *Hoplias*, podemos concluir que a quebra de barreiras entre bacias hidrográficas, tanto por vias naturais e/ou antrópicas, podem colocar em simpatria populações que estavam anteriormente isoladas, alterando a organização hierárquica da ictiofauna dessas bacias.

Considerando que os grupos *H. malabaricus* e *H. lacerdae* exibem uma evolução cariotípica extremamente diferenciada, os dados citogenéticos obtidos para *H. malabaricus*

(cariomorfos A e F) e para os espécimes de *H. intermedius*, reforçam as diferenças cariotípicas significantes entre tais grupos. Os marcadores utilizados permitiram não só uma boa caracterização citotaxonômica de cada um desses grupos, assim como a identificação de possíveis características derivadas no grupo *H. malabaricus*.

Além da grande diversidade cariotípica entre os cariomorfos, pode ser também evidenciadas diferenciações dentro de um mesmo cariomorfo. Populações alopátricas do cariomorfo A, provenientes das bacias do rio Xingu, Araguaia/Tocantons e São Francisco, mostraram especificidades para todos os marcadores utilizados, ao lado de sítios cromossômicos conservados entre tais populações. Assim sendo, os marcadores cromossômicos utilizados se mostraram adequados para a identificação da biodiversidade entre diferentes populações do cariomorfo A, ressaltando a variação genética presente dentro do grupo *H. malabaricus*. Tais diferenças são provavelmente oriundas de uma série de fatores, como a grande distribuição geográfica de *H. malabaricus* e a possibilidade de formarem isolados decorrentes de barreiras geográficas. Além disso, suas características ecológicas favoráveis à dispersão e fácil adaptação a novos ambientes, podem ter também favorecido a fixação da grande diversidade cariotípica existente nesse grupo de peixes.

Em contrapartida, o grupo *H. lacerdae* (trairões), agora bem caracterizado pelas espécies *H. intermedius*, *H. aimara*, *H. curupira*, *H. australis*, *H. brasiliensis* e *H. lacerdae*, evidenciam uma similaridade macrocariotípica, quando comparado com os outros eritrínideos. No presente trabalho foram caracterizados os cariótipos de *H. intemedius* e *H. aimara*, através de metodologias de citogenética clássica e molecular. Apesar da conservação da macroestrutura cariotípica uma análise cromossômica mais refinada, utilizando o mapeamento citogenético dos sítios de DNAs ribossômicos e DNA Cot-1 das duas espécies, evidenciou diferenças marcantes entre elas no tocante à essa fração repetitiva do genoma. Tais diferenças auxiliam na identificação dessas duas espécies do grupo *H. lacerdae*, permitindo também inferir que *H.*

*aimara* apresenta algumas características derivadas no seu genoma, como a presença de uma fração de DNA repetitivo exclusiva e sítios múltiplos de rDNA 18S.

Em conclusão, os dados ora obtidos mostraram-se de importância para a caracterização da diversidade, evolução e dispersão de espécies do gênero *Hoplias*. Foram particularmente de interesse no tocante à problemática associada à transposição do rio Piumhi e à caracterização de espécies do grupo *H. lacerdae*, onde os dados existentes, embora elucidativos, ainda se mostram escassos comparativamente aos já disponíveis no grupo *H. malabaricus*.

## **ANEXO I**

**Characterization of invasive fish species in a river  
transposition region: Evolutionary chromosome studies in the genus  
*Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae).**

**Daniel Rodrigues Blanco<sup>1</sup>, Roberto Laridondo Lui<sup>1</sup>, Luiz Antonio Carlos Bertollo<sup>1</sup>, Débora Diniz<sup>2</sup>, Orlando Moreira Filho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

# Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae)

Daniel Rodrigues Blanco · Roberto Laridondo Lui ·  
Luiz Antonio Carlos Bertollo · Débora Diniz ·  
Orlando Moreira Filho

Received: 3 March 2009 / Accepted: 23 April 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Karyotypic analyses were performed in fishes from the genus *Hoplias* (*H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups) from the São Francisco River basin (Brazil), in an impacted region by a river transposition which altered the local ecology and fish fauna. The karyotypes were investigated using chromosomal markers obtained from classic and molecular cytogenetics (Giemsa, CMA<sub>3</sub> and DAPI staining, C-banding, Ag-NORs, and FISH with 18S rDNA, 5S rDNA and 5SHindIII satellite DNA probes). Two karyotypic forms were found for the *H. malabaricus* group—karyomorph F, corresponding to the native form from the São Francisco River basin, and karyomorph A, corresponding to the invading form from the Upper Paraná River basin. Specimens from the *H. lacerdae* group exhibited striking chromosome differences in relation to the *H. malabaricus* group, thereby enabling good cytotaxonomic characterization and inferences regarding the karyotype evolution of these groups.

**Keywords** *H. malabaricus* · *H. lacerdae* · Karyotypes · Cytotaxonomy · Biological invasion

## Introduction

The Furnas Hydroelectric Plant was the first large power plant constructed in Brazil and was part of a project to solve the energy crisis that threatened the three largest socioeconomic centers of the country (São Paulo, Rio de Janeiro and Belo Horizonte) in the mid 1950s (Moreira-Filho and Buckup 2005). Its construction on Grande River, in the Upper Paraná River basin (between the cities of São José da Barra and São João Batista in the countryside of the state of Minas Gerais), was of fundamental importance to the development of the central-western region at the time. However, upon closing the gates of the dam for the formation of the Furnas reservoir, the volume of water would have flooded part of the city of Capitólio. In order to avoid this problem, a dike was built near the city to contain the water from the Furnas reservoir and it was necessary to dam the waters of the Piumhi River—a former tributary of the right bank of Grande River (Upper Paraná River basin), as well as to divert the course of that river to the São Francisco River basin (Moreira-Filho and Buckup 2005; Moreira-Filho 2006) (Fig. 1).

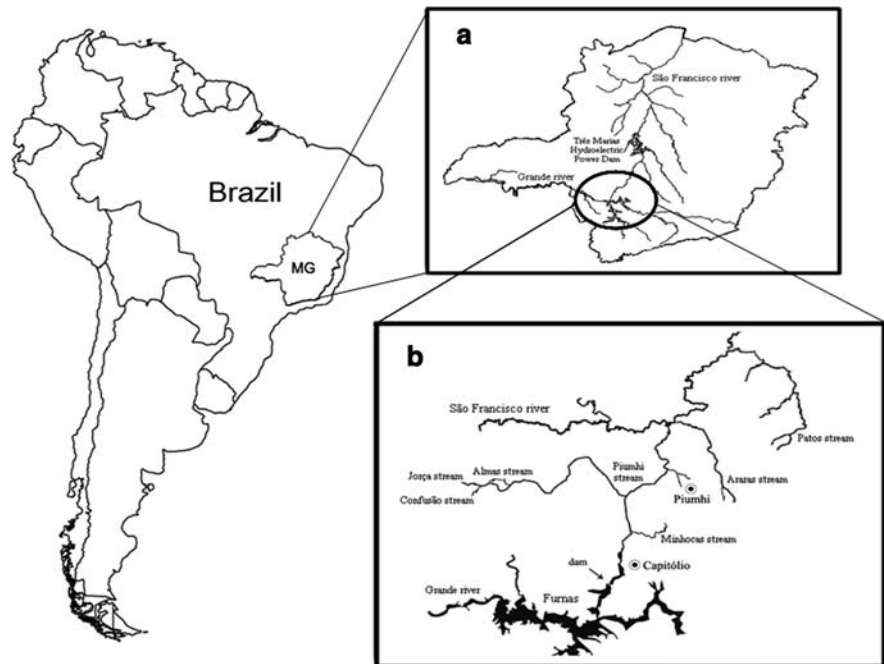
As a consequence of this transposition, the fish fauna of the Piumhi River and its tributaries, which

---

D. R. Blanco · R. L. Lui · L. A. C. Bertollo (✉) ·  
O. M. Filho  
Departamento de Genética e Evolução,  
UFSCar—Universidade Federal de São Carlos,  
São Carlos, SP, Brazil  
e-mail: bertollo@ufscar.br

D. Diniz  
Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia,  
UNESP—Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP,  
Brazil

**Fig. 1** Location of Brazilian sampling sites. **a** Minas Gerais State, **b** Transposition region of the Piumhi River



represent part of the fish species of the Grande River basin, were transferred to the São Francisco River basin, causing a mixture of previously isolated fish faunas (Moreira-Filho 2006). Representatives from the family Erythrinidae are among the groups of fish that may have experienced severe impact from this anthropogenic action. This family is made up of three genera: *Hoplerythrinus*, *Erythrinus* and *Hoplias*, which have broad geographic distribution. Based on morphological data, Brazil has eight species from this family, five of which belonging to the genus *Hoplias* (Oyakawa and Netto-Ferreira 2007). *Hoplias* is the most widespread genus in South América, with two large groups in southeastern Brazil: *H. malabaricus* and *H. lacerdae*. Although *H. lacerdae* and *H. malabaricus* are morphologically similar, there are some evident differences among them. In *H. malabaricus*, for example, the teeth lines of the gular region are convergents in the anterior region, with a “V” shape, while in *H. lacerdae* these lines are almost parallel. In addition, these groups exhibit striking differences in both the number and morphology of the chromosomes, useful for evolutionary and cytotaxonomic studies (Bertollo et al. 2000; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz and Bertollo 2003).

According to Bertollo et al. (2000), *H. malabaricus* constitutes a species complex due to its conspicuous karyotype diversity. Seven karyotype forms—or karyomorphs (A through G)—are clearly identified based on the diploid number, chromosome morphology and sex chromosome systems. While some karyomorphs have wide geographic distribution in different hydrographic basins throughout South América, others are endemic, even occurring in sympatric conditions without detection of hybrid forms (Table 1). Contrarily, representatives from the *H. lacerdae* group exhibit a more conserved karyotype evolution—at least among the specimens analyzed thus far—and have a diploid number of  $2n = 50$  meta-submetacentric chromosomes, with no differentiated sex chromosome systems (Bertollo et al. 1978; Bertollo and Moreira-Filho 1983; Morelli et al. 2007).

The aim of the present study was to employ classic and molecular cytogenetic procedures in order to characterize representatives from the *H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups in the transposition region of the Piumhi River. The results enable inferences regarding the consequences of this transposition on the current composition of regional fish fauna of the São Francisco River basin.

**Table 1** Chromosomal characteristics of *Hoplias malabaricus* karyomorphs, according Bertollo et al. (2000)

Karyomorph	2n	Sex chromosome system	Geographic distribution
A	42	Not differentiated	From Northern to Southern Brazil, Uruguay and Northern Argentina
B	42	Female: XX; male: XY	Vale do Rio Doce (MG State) and first plateau of the Iguaçú River (PR State)—Brazil
C	40	Not differentiated	From northern Brazil to northeastern Argentina
D	39/40	Female: X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> ; male: X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Upper Paraná hydrographic basin
E	42	Female : unknown	Trombetas River (PA State)—Brazil
F	40	Not differentiated	From Surinam to southeastern Brazil (preferential in the oriental part of the continent)
G	40/41	Female: XX; male: XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	Amazonian rivers

## Materials and methods

Specimens from the genus *Hoplias*, pertaining to the *lacerdae* and *malabaricus* groups, were collected from different places (Furnas Dam, Patos, Minhocas, Araras, Almas, Confusão, Jorça and Água Limpa streams) located in the transposition region of the Piumhi River, totaling 42 specimens (Fig. 1). Nine specimens were representatives of the *lacerdae* group (six males and three females) and 33 were representatives of the *malabaricus* group (20 males and 13 females). Furthermore, eighteen specimens from the *malabaricus* group (four males and 14 females) were also collected from the Três Marias Dam (Minas Gerais).

Mitotic chromosomes were obtained from cells of the anterior kidney (Bertollo et al. 1978) and classified as metacentric (m) or submetacentric (sm), depending on the arm relationship (Levan et al. 1964). The distribution of C-positive heterochromatin and nucleolar organizer regions (Ag-NORs) were analyzed based on the procedures described by Sumner (1972) with some modifications (Lui et al. 2009) and Howell and Black (1980), respectively, using the same metaphases previously stained with Giemsa (sequential analysis). The occurrence of GC-rich or AT-rich chromosome sites was investigated using the base-specific fluorochromes Chromomycin A3 and DAPI, respectively, following the procedures described by Schmid (1980). Fluorescent in situ hybridization (FISH) was carried out according to Pinkel et al. (1986), using 18S rDNA (Hatanaka and Galetti 2004), 5S rDNA (Martins and Galetti 1999) and 5S*Hind*III satellite DNA (Martins et al. 2006) probes. The probes were labeled with biotin-14-dATP

by nick translation, following the manufacturer's instructions (Bionick Labeling System—Invitrogen). The chromosomes were analyzed in an epifluorescence microscope (Olympus BX50). The Image-Pro Plus version 6.3 software program (Media Cybernetics) was used for imaging.

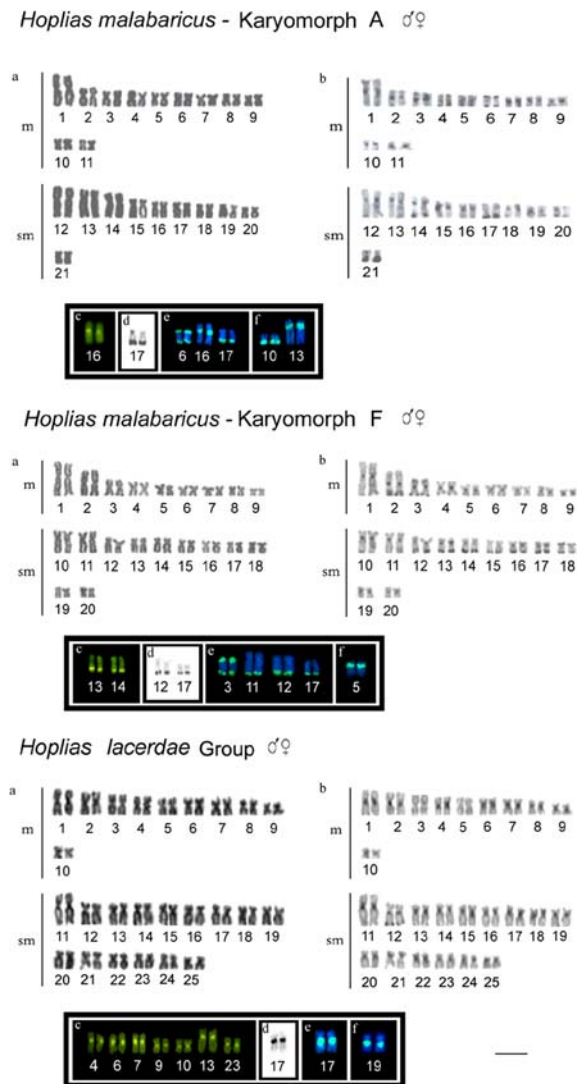
## Results

### *Hoplias malabaricus* group

Among the 36 specimens analyzed from the *malabaricus* group, 19 pertained to karyomorph A and 17 pertained to karyomorph F, based on the classification adopted by Bertollo et al. (2000).

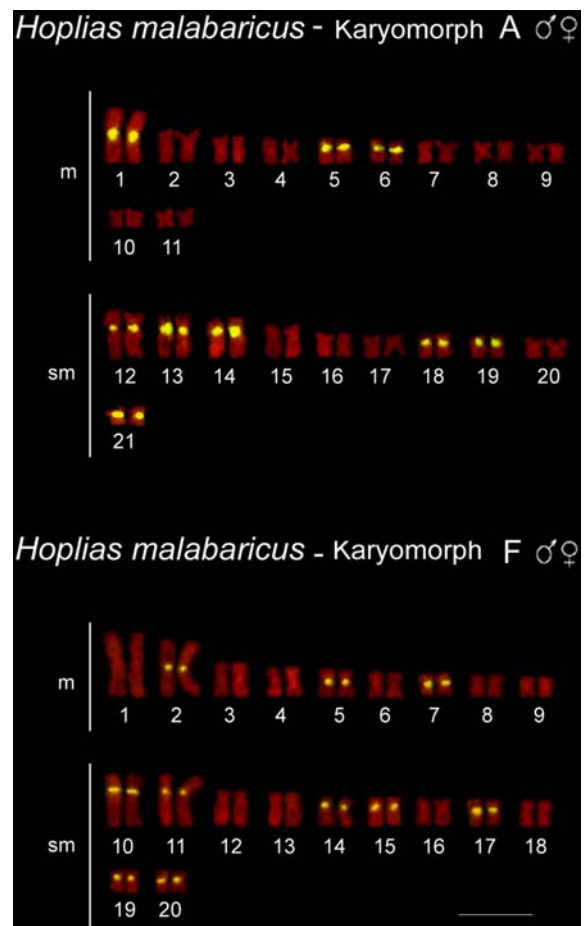
### Karyomorph A

All specimens had  $2n = 42$  chromosomes (22m + 20sm), FN = 84, in males as well as females, with no chromosomal heteromorphism related to sex. These specimens came from Furnas Dam, Minhocas, Almas, Confusão, Jorça and Patos Streams demonstrating the predominance of this karyomorph at these sites (Fig. 1). C-banding showed C-positive heterochromatin located on the pericentromeric regions in most chromosomes, with some chromosomes also exhibiting terminal bands. Submetacentric pair n° 17 was clearly noteworthy with a large C-band in the terminal region of the long arms, coinciding with the nucleolar organizer region (Ag-NOR). A single fluorescent GC-rich band was identified in this karyomorph, located in the pericentromeric region of pair n° 16. No AT-rich bands were found. In situ hybridization showed two



**Fig. 2** Karyotypes of the specimens analyzed showing **a** Giemsa staining; **b** C-banding; **c** CMA<sub>3</sub> staining; **d** Ag-NORs; **e** 18S rDNA sites; **f** 5S rDNA sites. Bar = 5 μm

chromosome pairs with 5S rDNA sites near to the centromeres, the metacentric pair n° 10 and the submetacentric pair n° 13. 18S rDNA sites were evident in three chromosome pairs—submetacentric pair n° 17 (in the terminal region of the long arms), submetacentric pair n° 16 (in the proximal region of the long arms) and metacentric pair n° 6 (with bi-telomeric sites, i.e., located in both telomeres) (Fig. 2). The 5SHindIII satellite DNA sites were located in nine chromosome pairs (metacentric pairs n° 1, 5, and 6;



**Fig. 3** *Hoplias malabaricus* karyomorphs A and F showing the 5SHindIII satellite DNA sites. Bar = 5 μm

submetacentric pairs n° 12, 13, 14, 18, 19 and 21), always in the centromeric regions (Fig. 3).

### Karyomorph F

All specimens had  $2n = 40$  chromosomes (18m + 22sm), FN = 80, in both males as well as females, with no differentiated sex chromosome system; these specimens came from the Três Marias Dam (Fig. 1). Heterochromatin was distributed in the pericentromeric region of most chromosomes, along with small terminal bands in some chromosomes of the karyotype. Two submetacentric chromosome pairs (n° 12 and n° 17) exhibited terminal Ag-NORs sites in the long arms. GC-rich regions were prominent in the terminal region of the long arms in only two chromosome pairs (submetacentric pairs n° 13 and



14). No AT-rich bands were found. 5S rDNA sites were located in the interstitial region of the long arms in only metacentric pair n° 5. 18S rDNA sites were identified in four chromosome pairs—in the terminal region of the long arms of submetacentric pairs n° 11, 12 and 17; and in both terminal regions (bi-telomeric sites) in metacentric pair n° 3 (Fig. 2). 5SHindIII satellite DNA was located in the centromeric regions of 10 chromosome pairs (metacentric pairs n° 2, 5 and 7; submetacentric pairs n° 10, 11, 14, 15, 17, 19 and 20) (Fig. 3).

#### *Hoplias lacerdae* group

The specimens pertaining to this group had  $2n = 50$  chromosomes (20m + 30sm), FN = 100, in both males as well as females; with no differentiated sex chromosomes; these specimens came from Furnas Dam, Araras and Água Limpa Streams (Fig. 1). C banding showed heterochromatin preferentially positioned in pericentromeric regions in nearly all chromosomes of the karyotype, as well as some bands in the terminal position (pair n° 12). Silver nitrate staining revealed only one pair of active nucleolar organizer regions, located in the interstitial region of the long arms in submetacentric pair n° 17, near the centromere. A greater number of GC-rich chromosome sites were identified in this group in comparison to the *H. malabaricus* group. Prominent sites were found in the region near the centromere in pairs n° 4, 6, 7 and 13, along with some less conspicuous sites in pairs n° 9, 10 and 23. No AT-rich regions were found. In situ hybridization revealed 5S rDNA sites in the long arms of submetacentric pair n° 19, near the centromere. Only chromosome pair n° 17 had 18S rDNA sites, which corresponded to the Ag-NORs location (Fig. 2). No 5SHindIII satellite DNA was detected in this species.

## Discussion

### Karyotype characterization

The specimens of Erythrinidae from the São Francisco River basin have chromosome characteristics that fit karyomorphs A and F of the *H. malabaricus* group (Bertollo et al. 2000) and the *H. lacerdae* group (Morelli et al. 2007). Besides the chromosome

number and macrostructure of the karyotype, a number of the chromosome markers employed support this identification (Fig. 2).

In all the karyomorphs of the *H. malabaricus* complex, heterochromatin is generally located in the pericentromeric and terminal region of some chromosome pairs (Dergam and Bertollo 1990; Haaf et al. 1993; Bertollo et al. 1997a, b; Born and Bertollo 2000; Vicari et al. 2005), which was corroborated in the present study. However, in the specimens from the *H. lacerdae* group, heterochromatin was found in the pericentromeric region in most of the chromosomes, with only one pair exhibiting terminal staining, which can therefore be considered an useful marker for distinction between the *H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups (Fig. 2). In addition, the location and amount of GC-rich heterochromatic sites were also relevant for this characterization. Thus, specimens from *H. malabaricus* karyomorphs A and F were differentiated by a single pericentromeric and two terminal sites, respectively, whereas specimens from the *H. lacerdae* group had a greater number of sites, located in seven chromosome pairs (Fig. 2).

Likewise, the NORs patterns were important differential markers. In *H. malabaricus*, two Ag-NOR sites and a total of six 18S rDNA were found in karyomorph A, whereas four Ag-NOR sites and ten 18S rDNA sites were found in karyomorph F. On the other hand, in the *H. lacerdae* group only two NORs and 18S rDNA sites were found, located in the long arms of a single submetacentric pair, near to the centromeric region (Fig. 2). Although the occurrence of multiple telomeric NORs is a common characteristic in the *H. malabaricus* group, interstitial NORs are found with less frequency (Bertollo 1996; Born and Bertollo 2001, 2006 Vicari et al. 2005), as in other genera of Erythrinidae, such as *Hoplerethrinus* (Diniz and Bertollo 2003). In *H. lacerdae* group, however, a single pair of NORs with an interstitial location appear to be the usual pattern for this group. Consequently, the occurrence of bi-telomeric NORs, which appears to be a common feature for the *H. malabaricus* group, is not found in the *H. lacerdae* group. The differences found in the *H. malabaricus* karyomorphs regarding the number of Ag-NOR and 18S rDNA sites are certainly due to differential gene activity between the loci of nucleolar organizer regions in the karyotype. Multiple NORs are generally considered a derived characteristic in relation to

a simple NOR system (Almeida-Toledo and Foresti 1985), thereby allowing the inference that, for this characteristic, *H. malabaricus* is a more derived group than the *lacerdae* one. In this way, the occurrence of more than two 18S rDNA sites found in specimens from the *lacerdae* group (Morelli et al. 2007) likely stems from a non-specific hybridization process, thus deserving further investigations.

Regarding 5S rDNA, karyomorph A presented two pairs of chromosomes bearing such sites, whereas only one pair of chromosomes was detected in karyomorph F and in the representative of the *H. lacerdae* group. However, the sites were located in an interstitial position on the long arms of the chromosomes in karyomorph F, whereas they occurred near the centromeric region in the *H. lacerdae* group (Fig. 2). Ferreira et al. (2007) compared the distribution and location of 5S rDNA clusters in three karyomorphs (A, D and F) of the *H. malabaricus* group, and found relevant differences among them, indicating that the number and distribution of 5S rDNA sites are also good markers for the Erythrinidae fish. The pericentromeric position of the 5S rDNA cluster could be considered a plesiomorphic condition for the genus *Hoplias* (Ferreira et al. 2007), as this site has also been found to be located in the same position in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Diniz and Bertollo 2003).

Regarding the 5SHindIII satellite DNA family, 18 sites were identified in karyomorph A and 20 sites were identified in karyomorph F, which corroborates findings described by Ferreira et al. (2007) for other populations of these same karyomorphs (Fig. 3). This repetitive DNA family has distribution restricted to the centromeric region of a number of chromosomes and, therefore, may exercise some role in the structure and/or function of the *H. malabaricus* centromeres (Martins et al. 2006). Ferreira et al. (2007) demonstrated that this DNA family is exclusive to the *H. malabaricus* group, which was confirmed in the present study. No such sequence was found in the specimens from the *H. lacerdae* group, as well as in specimens from the genera *Hoplerythrinus* and *Erythrinus*, suggesting that this satellite DNA family have originated or were lost after the divergence of *H. malabaricus* from the other erythrinid species (Ferreira et al. 2007).

The *H. malabaricus* and *H. lacerdae* groups exhibit an extremely differentiated karyotype evolution (Bertollo 2007). The data from the present study

also highlighted significant differences between these two groups as well as between karyomorphs A and F of the *H. malabaricus* group (Figs. 2, 3), allowing good cytotaxonomic characterizations of such groups, as well as the identification of possible derived features for the *H. malabaricus* group.

#### Consequences of transposition

The breakage of natural barriers may allow the contact between previously isolated species. This event may either be due to natural geomorphological changes, causing the river transposition from one basin to another adjacent basin (the headwater capture event, according Ab'Saber 1957), or due to artificial changes caused by anthropogenic actions. Indeed, some species of fish, such as *Serrasalmus marginatus* (Agostinho and Júlio 2002), *Hoplias malabaricus*—karyomorph C (Pazza and Júlio 2003) and *Gymnotus pantanal* (Margarido et al. 2007), which were once characterized as being from the Lower Paraná River basin, are now found in sympatry with native species of the Upper Paraná River, following the construction of the Itaipu dam.

The Piumhi River is a notable example of artificial connection between different hydrographic basins, as the entire fish fauna of this river was transposed to the São Francisco River basin (Moreira-Filho and Buckup 2005) (Fig. 1). In the same region prior to the transposition, however, there may have a natural connection also playing an important role in the mixture of the fish fauna, although on a lesser scale when compared to the transposition of the Piumhi River. This hypothesis is supported by an analysis of old local maps, on which one can see that the springs of some tributaries on the left bank of the Piumhi River, as well as the former Cururu wetland, are located at similar altitudes (~800 m) with a short distance (400 m–1 km) from tributaries on the right bank of the São Francisco River, in the same region. Thus, it is likely that connections occurred between the waters of the Grande River basin and those of the São Francisco through the Cururu wetland during floods, representing a likely natural migratory route for fish.

Based on previously available data, karyomorph A of the *H. malabaricus* group has a broad geographic distribution from northern to southern Brazil, including the Grande River basin, and reaching Uruguay and

Argentina (Bertollo et al. 2000). Fish from the São Francisco River basin have been intensely studied over the last 20 years with regard to cytogenetics. Throughout this time, only three specimens of karyomorph A have been identified for this basin, from the Três Marias region, where karyomorph F represents the native form (Bertollo et al. 2000). In the present study, only populations of karyomorph A were identified in the transposition region of the Piumhi River, in streams, lagoons and the main river channel. No specimens from karyomorph F were found in this region. Thus, considering that karyomorph A is frequently found in Grande River and the transposition region of the Piumhi River, it can be concluded that this karyomorph may represent an invading form in the São Francisco River basin, having been dispersed as far as the Três Marias region.

Field observations have evidenced that specimens of the karyomorph A is more aggressive than specimens of the karyomorph F. This may have favored the expansion of this invasive form and the consequent displacement of karyomorph F, with the former invading the habitat previously occupied by the latter form. However, ecological and behavioral studies, associated to cytogenetic data, are needed to demonstrate possible competition between these karyomorphs.

Classical and molecular cytogenetic data on the *H. lacerdae* group demonstrate that the specimens from the Grande River and the transposition region of the Piumhi River have the same karyotypic form. Thus, it is possible that natural connections—such as those in the former Cururu wetland—have enabled the dispersion of specimens from this group in both the Upper Paraná River and São Francisco River basins. This species was only collected from oxygen-rich and crystalline running waters, unlike *H. malabaricus*, which was collected from lagoons and backwaters of the transposition canals. According to Rantin et al. (1992), *H. lacerdae* requires a greater amount of oxygen than *H. malabaricus* and other genera of Erythrinidae. This indicates that the occurrence of *H. lacerdae* in the São Francisco River basin (transposition region), without competition with the *H. malabaricus* karyomorphs, may be related to the different habitats that they live. Godoy (1975) also reports that *H. lacerdae* and *H. malabaricus* are ecologically distinct, despite being morphologically similar, which corroborates our hypothesis.

The present study, with basis on the genus *Hoplias* data, indicates that the breakage of the natural barrier between the Grande River and São Francisco River basins (represented by the transposition of the Piumhi River and the probable natural connection between these two hydrographic basins) promoted a probable change in the hierarchy organization of the fish fauna of the Upper São Francisco River.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa for the identification of the specimens; to the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA—License number: 10538-1) and the Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG), for authorizations to fish capture. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- Ab'Saber NA (1957) O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e do Tietê. *Geomorfologia* 26:39–49
- Agostinho CS, Júlio HF Jr (2002) Observation of an invasion of piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the Upper Paraná River, Brazil. *Acta Sci* 24:391–395
- Almeida-Toledo LF, Foresti F (1985) As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. *Cienc Cult* 37(3):448–453
- Bertollo LAC (1996) The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. *Cytologia* (Tokyo) 61:75–81
- Bertollo LAC (2007) Chromosomal evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish cytogenetics*, 1st edn. Science Publishers, Enfield
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1983) Possível ocorrência de uma nova espécie do gênero *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae): evidências morfológicas e citogenéticas. *Cienc Cult* 35(Suppl):685
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet* 1:103–120
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997a) The X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res* 5:493–499. doi:10.1023/A:1018477232354
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS (1997b) Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotypes with 2n = 40 chromosomes. *Brazil J Genet* 20:237–242
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes

- and cytotoxic considerations. *Chromosome Res* 8:603–613. doi:[10.1023/A:1009233907558](https://doi.org/10.1023/A:1009233907558)
- Born GG, Bertollo LAC (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. doi:[10.1023/A:1009238402051](https://doi.org/10.1023/A:1009238402051)
- Born GG, Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. *Genetica* 110:1–9. doi:[10.1023/A:1017572030350](https://doi.org/10.1023/A:1017572030350)
- Born GG, Bertollo LAC (2006) A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Biol* 66:205–210. doi:[10.1590/S1519-69842006000200004](https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000200004)
- Dergam JA, Bertollo LAC (1990) Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *J Genet* 13:755–766
- Diniz D, Bertollo LAC (2003) Karyotypic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia* 56:303–313
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C (2007) Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. *Cytogenet Genome Res* 118:78–83. doi:[10.1159/000106445](https://doi.org/10.1159/000106445)
- Giuliano-Caetano L, Jorge LC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetic studies on *Hoplerethrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia* (Tokyo) 66:39–43
- Godoy MP (1975) Família Erythrinidae. In: Godoy MP (ed) Peixes do Brasil, subordem Characoidei, vol 3. Ed. Franciscana, Piracicaba, SP Brazil
- Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti PM Jr, Willard HF (1993) Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Res* 1:77–86. doi:[10.1007/BF00710610](https://doi.org/10.1007/BF00710610)
- Hatanaka T, Galetti PM Jr (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239–244. doi:[10.1007/s10709-004-2039-y](https://doi.org/10.1007/s10709-004-2039-y)
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014–1015. doi:[10.1007/BF01953855](https://doi.org/10.1007/BF01953855)
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*. doi:[10.1016/j.micron.2009.03.004](https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.03.004)
- Margarido VP, Bellafronte E, Moreira-Filho O (2007) Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brasil. *J Fish Biol* 70:155–164. doi:[10.1111/j.1095-8649.2007.01365.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01365.x)
- Martins C, Galetti PM Jr (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363–367. doi:[10.1023/A:1009216030316](https://doi.org/10.1023/A:1009216030316)
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141. doi:[10.1007/s10709-005-2674-y](https://doi.org/10.1007/s10709-005-2674-y)
- Moreira-Filho O (2006) Uma transposição esquecida. *Rev Univ Fed Goiás VIII*(2):77–82
- Moreira-Filho O, Buckup PA (2005) A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná River basins. *Neotrop Ichthyol* 3:449–452. doi:[10.1590/S1679-62252005000300015](https://doi.org/10.1590/S1679-62252005000300015)
- Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC (2007) Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Braz J Biol* 67(Suppl):897–903. doi:[10.1590/S1519-69842007000500013](https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000500013)
- Oyakawa OT, Netto-Ferreira AL (2007) Erythrinidae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (eds) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional—Universidade Federal do Rio de Janeiro, Série Livros 23, Rio de Janeiro, p 195
- Pazza R, Júlio HF Jr (2003) Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná River floodplain (Brazil). *Cytologia* (Tokyo) 68:159–163. doi:[10.1508/cytologia.68.159](https://doi.org/10.1508/cytologia.68.159)
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938. doi:[10.1073/pnas.83.9.2934](https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934)
- Rantin FT, Kalinin AL, Glass ML, Fernandes MN (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J Fish Biol* 41:805–812. doi:[10.1111/j.1095-8649.1992.tb02708.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02708.x)
- Schmid M (1980) Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 7:83–103. doi:[10.1007/BF00292043](https://doi.org/10.1007/BF00292043)
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306. doi:[10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2005) Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet Mol Biol* 28:103–110. doi:[10.1590/S1415-47572005000100018](https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100018)