



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

***Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae): um complexo de espécies. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares**

Juliana de Fatima Martinez

**São Carlos
2014**

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

***Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae): um complexo de espécies. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares**

Juliana de Fatima Martinez

São Carlos
2014

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

***Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae): um complexo de espécies. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares**

Juliana de Fatima Martinez

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui**

**São Carlos
2014**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

M385hu Martinez, Juliana de Fatima.
 Hoplerythrinus unitaeniatus (Characiformes, Erythrinidae)
 : um complexo de espécies. Estudos citogenéticos clássicos
 e moleculares / Juliana de Fatima Martinez. -- São Carlos :
 UFSCar, 2014.
 113 f.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
 Carlos, 2014.

 1. Citogenética de peixes. 2. Erythrinidae. 3. Diversidade
 cromossômica. 4. Marcadores genéticos. 5. Híbridos
 naturais. 6. DNA ribossômico. I. Título.

CDD: 597.087322 (20^a)

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

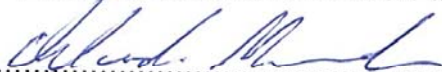
**“*Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae): um
complexo de espécie. Estudos citogenéticos clássicos e
moleculares”**

Dissertação de Mestrado de

JULIANA DE FATIMA MARTINEZ

Banca Examinadora

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui



Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni



Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido



Aos meus pais, Cassia e Geraldo.

*“Nem sempre podemos mudar o rumo das coisas.
Mas podemos determinar a melhor forma de chegar
ao final” (Sirlei L. Passolongo)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à (aos):

Deus, de Quem eu me afastei tantas vezes, mas que nunca se afastou de mim.

Meus pais, Cassia e Geraldo, por todo amor, carinho e ensinamentos ao longo de todos esses anos. Amo vocês! E a toda minha família, em especial aos meus irmãos Jana e Léo, meu cunhado Cesar e minha sobrinha, minha linda bonequinha, Rafaela, pelo amor e apoio durante todos esses anos

Meu orientador Prof. Dr. Orlando Moreira Filho pela oportunidade de realizar este trabalho. Além dos ensinamentos diários, confiança e amizade, que foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal.

Meu co-orientador Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui, pela amizade, ensinamentos e paciência ao longo de todos esses anos.

Minha eterna amiga e companheira de laboratório Josi, pelos dias bons e ruins de convivência, pelos ensinamentos e conversas, e por sempre estar disposta a me ajudar. Minha irmã do coração e pra quem eu digo que “amizade é um amor que nunca morre”.

Todos os amigos e colegas de trabalho do laboratório de citogenética de peixes.

Meu amigo Daniel pela amizade, ensinamentos e disposição em sempre ajudar.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo Nº 2011/14960-0), pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

ICMBio pela licença de coleta concedida.

Todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA DE FATIMA MARTINEZ - Nasceu em 9 de dezembro de 1986, na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Iniciou sua graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas no ano de 2007 na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* de São Carlos. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq durante os anos de 2008-2010 e bolsista FAPESP (Processo 2010/09325-1) nos anos de 2010-2011, ambos sob a orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho. No ano de 2012 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, na UFSCar, também sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho e sob co-orientação do Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui (professor adjunto da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE), sendo bolsista FAPESP (Processo 2011/14960-0). Durante esse período vem participando de projetos de pesquisa coordenados pelo seu orientador. Apresenta cinco artigos publicados em periódicos da área e um aceito para publicação. Participou de doze eventos científicos e possui vinte e oito resumos em anais de congressos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ordem Characiformes	1
1.2. Família Erythrinidae.....	2
1.3. Gênero <i>Hoplerythrinus</i>	3
1.4. Estudos cromossômicos em <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	5
1.5. Considerações gerais sobre complexo de espécies em peixes	7
1.6. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos	9
1.7. Caracterização dos locais de estudo	13
Bacia do rio Amazonas.....	13
Bacia do rio Araguaia-Tocantins	14
Bacia do rio Paraguai	14
Bacia do Alto rio Paraná	15
Bacia do rio São Francisco.....	16
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Metodologia Clássica	22
Tratamento “in vivo”	22
Tratamento “in vitro”	23
Método alternativo para a obtenção cromossomos em peixes	23
Indução ao aumento do número de mitoses e suspensão de levedura.....	24
Preparo de lâminas	25
Determinação de heterocromatina.....	25
Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) - Impregnação por prata.....	25
Estudos cariotípicos	26
3.2. Metodologia Molecular	26
Extração de DNA total com fenol:clorofórmio	26
Dupla e Simples Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente, (protocolo de Pinkel et al. 1986).....	27

Obtenção e marcação das sondas	27
Dupla hibridização e detecção de sinal	28
Simple hibridização e detecção de sinal	29
Simple Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (protocolo de Kubat et al. 2008).....	30
Obtenção e marcação das sondas	30
Hibridização e detecção de sinal	30
Análise dos resultados.....	31
4. REFERÊNCIAS (Introdução, Materiais e Métodos).....	31
5. RESULTADOS	45
CAPÍTULO I.....	46
Análise Citogenética de <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Characiformes, Erythrinidae) da bacia do rio São Francisco: ocorrência de dois cariomorfos em simpatria e de híbridos naturais. Erro! Indicador não definido.	
RESUMO	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO II	67
Citogética comparativa entre populações do complexo <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Characiformes, Erythrinidae) proveniente de diferentes bacias hidrográficas brasileiras	67
RESUMO	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	85
CAPÍTULO III	90
Mapeamento físico de diferentes classes de DNA repetitivo no genoma de <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Characiformes: Erythrinidae) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras.....	90
RESUMO	91

INTRODUÇÃO	92
MATERIAS E MÉTODOS	93
RESULTADOS	94
DISCUSSÃO.....	102
REFERÊNCIAS	106
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112

LISTA DE FIGURAS

MATERIAIS e MÉTODOS

Figura 1: Exemplar de <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> coletado na bacia do rio Araguaia Comprimento total:20cm.....	19
Figura 2: Mapa da América do Sul com todos os pontos de coleta.....	21

CAPÍTULO I

Figura 1: Cariótipos das <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> da bacia do rio São Francisco. Cariótipo corado com Giemsa e posteriormente C bandado (a - 2n=50) e (b - 2n=52). Cariótipo corado com Giemsa mostrando as três fórmulas cariotípicas encontradas nos espécimes com 2n=51 (h1, h2, h3) (c). Em destaque são apresentados os pares cromossômicos portadores da AgRONS para cada cariótipo. Barra=10µm.....	53
Figura 2: Cariótipos das <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> proveniente da bacia do rio São Francisco hibridados com sondas de DNAr 18S (FITC - sinal verde) e DNAr 5S (Rodamina - sinal vermelho). Cariótipos com 2n=50 (a), Cariótipos com 2n=52 (b), Cariótipo mostrando as três fórmulas cariotípicas encontradas nos espécimes com 2n=51 (h1, h2, h3) (c). Barra=10µm.....	54

CAPÍTULO II

Figura 1: Cariótipos das <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> provenientes das bacias do rio Arinos (a,b), rio Araguaia (c,d), rio Paraguai (e, f), Alto rio Paraná (g, h), rio São Francisco (i, j - 2n=50; k, l - 2n=52). Cariótipos corados com Giemsa (a, c, e, g, j, k) e posteriormente C bandados (b, d, f, h, j, l). Em Box	
--	--

são apresentados os pares cromossômicos portadores de AgRONS para cada população.

Barra=10µm.....75

Figura 2: Cariótipos das *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridados com sondas DNAr 18S (FITC – sinal verde) e DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) provenientes das bacias do rio Arinos (a), rio Araguaia (b), rio Paraguai (c), Alto rio Paraná (d) e rio São Francisco (e – 2n=50; f – 2n=52). Barra=10µm....76

Figura 3: Distribuição dos cariormorfos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* estudados até o momento....84

CAPÍTULO III

Figura 1: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridadas com sonda de sequência telomérica (TTAGGG)_n (FITC – sinal verde). Barra=10µm.....96

Figura 2: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridadas com sondas de microsátélites (Cy3 – sinal vermelho e FITC – sinal verde) Barra=10µm.....97

Figura 3: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes da bacia do rio São Francisco hibridadas com sondas de microsátélites (Cy3 – sinal vermelho e FITC – sinal verde). Barra=10µm.....98

Figura 4: Sequências parciais das histonas H3 (a) e H4 (b).....99

Figura 5: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridadas com sonda de histona H3 (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10µm.....100

Figura 6: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridadas com sonda de histona H4 (Rodamina – sinal vermelho). Barra=10µm.....101

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS e MÉTODOS

Tabela 1: Exemplos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* coletados e suas respectivas localidades.....20

CAPÍTULO I

Tabela 1: Números diplóides, fórmulas cariotípicas e respectivas frequências observadas na população de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.....51

Tabela 2: Revisão dos cariomorfos de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.....62

CAPÍTULO II

Tabela 1: Exemplos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* coletados e suas respectivas localidades.....72

Tabela 2: Resultados da FISH com sondas de DNAr 18S e 5S para as populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.....75

Tabela 3: Revisão dos cariomorfos de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.....84

RESUMO

O Brasil possui uma ampla e densa rede hidrográfica distribuída em oito grandes bacias, com uma grande diversidade de espécies de peixes. Erythrinidae é uma pequena família de Characiformes, representada por apenas três gêneros: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias*. *Hoplerythrinus* possui apenas três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) e *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829), sendo que apenas esta última é encontrada em território brasileiro, além de ocorrer também na América Central e em vários outros países da América do Sul. *Hoplerythrinus cinereus* e *H. gronovii* possuem uma distribuição mais restrita e ocorrem apenas em Trinidad e Tobago e Guiana Francesa, respectivamente. Somente *H. unitaeniatus* possui estudos citogenéticos, demonstrando ser uma espécie cromossomicamente diversa e indicando se tratar de um complexo de espécie. Com o intuito de progredir no conhecimento do genoma de *H. unitaeniatus*, este trabalho teve por objetivo caracterizar, através de coloração convencional por Giemsa, bandamento C, impregnação por nitrato de prata e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S, seqüência telomérica (TTAGGG)_n, histonas (H3 e H4), e microsatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ e (GATA)_n, populações de *H. unitaeniatus* provenientes de cinco bacias hidrográficas brasileiras (Amazonas, Araguaia, Paraguai, Alto Paraná e São Francisco). Os números diplóides encontrados foram 2n=48 (Paraguai e Alto Paraná), 2n=50 (São Francisco) e 2n=52 (Amazônia, Araguaia e São Francisco), além da ocorrência de híbridos naturais com 2n=51 cromossomos na bacia do São Francisco. O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina localizados em posição intersticial e pericentromérica na maioria dos cromossomos, contudo alguns cromossomos também apresentaram blocos heterocromáticos em posição centromérica e terminal em todas as populações. A impregnação por nitrato de prata revelou AgRONS simples para as populações da Amazônia e Araguaia e AgRONS múltiplas para as populações do Paraguai, Alto Paraná e São Francisco. A FISH com sondas de DNAr

18S e 5S revelou vários cromossomos portadores desses cístrons, além da ocorrência de sintenia em todas as populações. A sonda de sequência telomérica (TTAGGG)_n detectou sítios restritos a porção terminal de todos os cromossomos. Para as histonas H3 e H4, foi verificado um padrão disperso pelo cromossomo, sendo que, principalmente para H4, foi verificado blocos mais fortes em posição intersticial. Já a distribuição cromossômica dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ no genoma de *H. unitaeniatus* mostrou-se alocado preferencialmente em posição terminal dos cromossomos com algumas regiões intersticiais marcadas. O microssatélite (GATA)_n apresentou-se disperso pelos cromossomos de todas as populações analisadas, sem um acúmulo preferencial em uma região cromossômica específica. Os dados obtidos neste trabalho vêm reforçar a hipótese de que *H. unitaeniatus* não se trata de uma única espécie, mas sim do complexo de espécie *H. unitaeniatus*.

ABSTRACT

Brazil has a large and dense hydrographic network distributed in eight major basins, with a great diversity of fish species. Erythrinidae is a small family of Characiformes, represented by only three genera: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* and *Hoplias*. *Hoplerythrinus* has only three species: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) and *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829) and only the latter is found in Brazil, besides also occurring in Central America and in several other countries in South America. *H. cinereus* and *H. gronovii* have a more restricted distribution and occur only in Trinidad and Tobago and Guyana, respectively. Only *H. unitaeniatus* has cytogenetic studies, proving to be a diverse chromosomally species, indicating it is a complex of species. In order to progress in the knowledge of the genome of *H. unitaeniatus*, this study aimed to characterize by conventional Giemsa staining, C-banding, impregnation with silver nitrate and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes of DNAr 18S and 5S, telomeric sequence (TTAGGG)_n, histones (H3 and H4), and microsatellite (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ and (GATA)_n, populations of *H. unitaeniatus* from five hydrographic basins in Brazil (Amazon, Araguaia, Paraguay, Upper Parana and São Francisco). The diploid numbers found were 2n=48 (Paraguay and Upper Parana), 2n=50 (São Francisco) and 2n=52 (Amazon, Araguaia and São Francisco), besides the occurrence of natural hybrids with 2n=51 chromosomes in the São Francisco basin. The C-banding showed heterochromatic blocks located in the interstitial and pericentromeric position in most chromosomes, but some chromosomes also showed heterochromatic blocks in the centromeric and terminal position in all populations. The impregnation with silver nitrate revealed simple AgNORs for populations of the Amazon and Araguaia and multiple AgNORs for the populations of Paraguay, Upper Parana and São Francisco. FISH with 18S and 5S DNAr probes revealed several chromosomes carrying these cistrons, besides the occurrence of synteny in all populations. Probes with telomeric sequence (TTAGGG)_n detected sites only in the terminal

portion of all chromosomes. A dispersed pattern was verified to H3 and H4 histones in the chromosomes and only for H4 was observed strongest blocks in the interstitial position. The chromosomal distribution of the microsatellites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ in the genome of *H. unitaeniatus* shown to be preferentially located in the terminal position of the chromosomes with some interstitial regions marked. The microsatellite (GATA)_n shown dispersed in the chromosomes without preferential accumulation in a specific region of the chromosome in all populations analyzed. The data obtained in this study reinforce the hypothesis that *H. unitaeniatus* it is not a single species, but the specie complex *H unitaeniatus*.

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical se estende desde o sul do México até a América do Sul. Com aproximadamente 24.600 espécies de peixes reconhecidas em todo o mundo, cerca de 8.000 pertencem a esta região, sendo a maior fauna de peixes de água doce conhecida (Graça e Pavanelli, 2007).

Os peixes têm se mostrado de grande interesse para a pesquisa científica, principalmente por constituírem um grupo muito diverso, no que diz respeito a sua morfologia, biologia e habitats (Nelson, 2006). Além disso, aspectos genéticos e citogenéticos também estão se mostrando bastantes diversos para o grupo, e são de grande importância para elucidar questões relacionadas aos diversos campos em que as interfaces são realizadas, como voltados para a taxonomia, biogeografia, ecologia, conservação, entre outras, além dos interessantes estudos relacionados aos processos de diversificação cromossômica.

1.1. Ordem Characiformes

Os Characiformes formam um grupo bastante diverso e encontram-se distribuídos em praticamente todos os ambientes de água doce, sendo localizados desde a fronteira México - Estados Unidos até o sul da Argentina, além de serem encontrados no continente africano (Lucena, 1993). Este grupo está distribuído em 23 famílias, com cerca de 270 gêneros e aproximadamente 1680 espécies. Desse total de espécies, 209 ocorrem na África e as restantes apresentam-se distribuídas pela região Neotropical, onde atingem sua maior diversidade, representando 30% da ictiofauna (Nelson, 2006).

Apresenta grande variação em relação ao número diplóide, sendo encontrados desde $2n=28$ (e.g. *Hemigrammus* Gill, 1858, Scheel, 1973) até $2n=102$ cromossomos (e.g., *Potamorhina altamazonica* (Cope, 1878), Feldberg et al. 1993; e *P. squamoralevis* (Braga & Azpelicueta, 1983), Brassesco et al. 2004).

1.2. Família Erythrinidae

Erythrinidae é uma pequena família de Characiformes, representada por apenas três gêneros: *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903, todos endêmicos da América do Sul, com ampla distribuição pelas bacias brasileiras, principalmente na bacia Amazônica (Oyakawa, 2003). Popularmente conhecidos como traíras e trairões (*Hoplias*) e jejus (*Hoplerythrinus* e *Erythrinus*), estes animais são preferencialmente carnívoros, sendo encontrados em diferentes habitats, como, lagos, lagoas, e grandes rios. Morfologicamente, esses peixes caracterizam-se por apresentar corpo cilíndrico e nadadeira caudal arredondada (Oyakawa, 2003). 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*, mostrando que o grupo apresenta uma datação biológica bastante antiga.

Hoplias é o gênero que apresenta maior distribuição geográfica, sendo separados em dois grupos: *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908. *H. malabaricus* tem se mostrado um grupo bastante heterogêneo, com grande diversidade cariotípica. As populações deste grupo apresentam-se distribuídas em 7 distintos cariomorfos (A-G), os quais diferem em relação ao número diplóide (variando de $2n=39$ a $2n=42$ cromossomos), estrutura cariotípica e ocorrência de cromossomos sexuais, os quais estão presentes no cariomorfos B (XX/XY), cariomorfo D ($X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$) e cariomorfo G (XX/ XY_1Y_2). Já os cariomorfos restantes (A, C, E e F) não apresentam um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos diferenciados (Bertollo et al. 2000). Já o grupo conhecido como trairões, que de acordo com Oyakawa e Mattox (2009) é composto por seis espécies consideradas válidas, *H. lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908, *H. brasiliensis* (Spix in Spix & Agassiz, 1829), *H. aimara* (Valenciennes, 1874), *H. curupira* Oyakawa & Mattox, 2009, *H. intermedius* (Gunther, 1864) e *H. australis* (Oyakawa & Mattox, 2009), possui estrutura cariotípica

conservada com $2n=50$ cromossomos, sendo estes dos tipos metacêntricos e submetacêntricos e sem ocorrência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados nas populações já estudadas (Morelli et al. 2007; Blanco et al. 2011).

Para *Erythrinus*, são descritas apenas duas espécies: *E. erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) e *E. kessleri* Steindachner, 1876, sendo que esta última tem ocorrência restrita no estado da Bahia (Oyakawa, 2003) e ainda não possui estudos citogenéticos (Bertollo, 2007). *Erythrinus erythrinus* compreende quatro cariomorfos que diferem em relação ao número diplóide, estrutura cariotípica e sistemas sexuais. Para o cariomorfo A é verificado a presença de $2n=54$ cromossomos e não há ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais, o cariomorfo B apresenta $2n=54/53$ cromossomos, com sistema sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e os cariomorfos C e D apresentam $2n=52/51$ cromossomos, com sistema sexual também do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, contudo, diferem entre si na estrutura cromossômica (Bertollo et al. 2004). Outra característica de *E. erythrinus* é a ocorrência de cromossomos B (Bertollo et al. 2004; Martins et al. in press).

1.3. Gênero *Hoplerythrinus*

Hoplerythrinus possui apenas três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) e *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829), sendo que apenas esta última é encontrada em território brasileiro, além de ocorrer também na América Central e em vários outros países da América do Sul. *H. cinereus* e *H. gronovii*, possuem uma distribuição mais restrita e ocorrem apenas em Trinidad e Tobago e Guiana Francesa, respectivamente (Oyakawa, 2003). Em relação a estudos citogenéticos, somente *H. unitaeniatus* possui caracterização cromossômica e aparenta ser uma espécie bastante diversificada, com 6 cariomorfos (A, B, C, D, E e F) já definidos (Bertollo, 2007; Da Rosa et al. 2012). Os cariomorfos A, B e E apresentam $2n=48$ cromossomos, sendo encontrados nas bacias dos rios

Amazonas (A e B), Paraguai (A) e Paraná (E). Os demais cariomorfos (C, D e F) possuem $2n=52$ cromossomos e podem ser encontrados na bacia do Leste (C e D) e na Bacia do rio São Francisco (F) (Bertollo, 2007; Da Rosa et al. 2012). A variação entre os cariomorfos está principalmente relacionada ao número diplóide e a morfologia dos cromossomos, indicando, assim, a ocorrência de rearranjos e aumento/redução do número diplóide (Bertollo, 2007). Este é o único gênero de Erythrinidae que não apresenta sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos (Giuliano-Caetano, 1986; Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988 e 1990; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012).

Atingindo até 40 centímetros de comprimento, são peixes bastante ativos, carnívoros, de crescimento rápido e ocorrem, principalmente, em águas de inundação temporária (Lowe-McConnel, 1999). O que torna *Hoplerythrinus* morfologicamente distinto dos demais membros da família Erythrinidae é a presença de uma mancha preta arredondada na região do opérculo e uma faixa preta ao longo do meio do corpo (Oyakawa, 2003).

Uma característica marcante tanto de *Hoplerythrinus* quanto de *Erythrinus* é a presença de uma bexiga natatória ricamente vascularizada, o que faz com que tenham uma respiração aérea facultativa utilizando essa bexiga natatória como órgão para tal função (Fernandes e Moron, 1996). Quando o ambiente encontra-se em hipóxia ou anóxia severa, o oxigênio passa a ser absorvido via bexiga natatória, permitindo sua sobrevivência durante períodos de estiagem. Sendo assim, diferentemente de *Hoplias*, que possui respiração exclusivamente aquática, tanto *Hoplerythrinus* quanto *Erythrinus* possuem respiração bimodal, utilizando não só as brânquias, mas também a bexiga natatória como órgão de respiração (Mariano et al. 2009).

Hoplerythrinus tem sido amplamente utilizado como isca viva, na pesca amadora e profissional, para a captura de outras espécies de peixes. De acordo com o Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul,

SCPESCA/MS, no ano de 2005 foram registrados 1.230.229 exemplares capturados na região do Pantanal, sendo que deste total, aproximadamente 36.900 correspondem aos peixes popularmente conhecidos como jejus (o que inclui tanto espécies de *Hoplerythrinus* quanto *Erythrinus*). Quanto ao destino dessas iscas, a maior parte foi comercializada no próprio Mato Grosso do Sul, sendo que o restante seguiu para os estados de Mato Grosso e Paraná. O comércio de iscas vivas é realizado da bacia do Alto Paraguai para outras bacias hidrográficas, dessa forma, havendo a possibilidade de introdução dessas espécies em outras bacias, o que pode acarretar em prejuízos ecológicos e econômicos.

Além disso, há outro fator que deve ser considerado referente à distribuição/dispersão de *H. unitaeniatus*, a chamada dispersão passiva (não intrínseca da biologia do peixe, mas dependente de fatores ambientais). Segundo Blanco et al. (2010), a espécie *H. malabaricus*, em épocas chuvosas, pode migrar de uma vertente de rio à outra através de filetes de água de poucos centímetros de profundidade, característica típica de espécies presentes em ambientes alagadiços. Entretanto, é plausível acreditar que *H. unitaeniatus* possa apresentar esse tipo de dispersão de forma mais acentuada que *H. malabaricus*, devido ao fato de apresentarem respiração aérea, o que possibilita que sua sobrevivência fora da água possa ocorrer por um maior período de tempo. No Pantanal, durante o período de estiagem, espécimes de *H. unitaeniatus* são facilmente encontrados em corpos d'água que se formam nessa região (Fink e Fink, 1978), e acabam migrando entre esses alagadiços, ficando assim, expostos ao ar atmosférico e respirando via bexiga natatória durante esse período (Kramer, 1978; Jucá-Chagas, 2004).

1.4. Estudos cromossômicos em *Hoplerythrinus unitaeniatus*

Os estudos citogenéticos em *H. unitaeniatus* se iniciaram na década de 1980. Giuliano-Caetano (1986) analisou uma população proveniente do rio Aripuanã (MT), pertencente à bacia do rio

Amazonas, que apresentou $2n=48$ cromossomos ($NF=96$), sendo todos do tipo meta/submetacêntrico. No mesmo ano, a autora também analisou apenas um exemplar proveniente da Lagoa de Jaturnaíba (RJ), na bacia do Leste, e este único exemplar apresentou $2n=52$ cromossomos ($NF=95$), sendo que 45 cromossomos eram do tipo meta/submetacêntricos e 9 cromossomos eram do tipo acrocêntrico.

Posteriormente, Giuliano-Caetano e Bertollo (1988), analisaram uma população proveniente do rio Negro (bacia Amazônica) a qual apresentou $2n=48$ cromossomos, tanto em machos quanto em fêmeas. Contudo, quatro variantes cariotípicas (citótipos A, B, C e D), baseadas na morfologia dos cromossomos, meta/submetacêntricos e subtelo/acrocêntricos, foram identificadas. Nesta mesma população, um espécime fêmea apresentou triploidia natural ($2n=3x=72$ cromossomos), sendo o cariótipo composto por 23 trincas de cromossomos meta/submetacêntricos e 1 trinca de cromossomos subtelo/acrocêntrico, compatível com o citótipo B dos indivíduos diplóides (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990).

Giuliano-Caetano et al. (2001), realizaram uma análise comparativa com populações de *H. unitaeniatus* provenientes de 5 localidades diferentes, sendo elas de Corrientes (Argentina), Miranda (Mato Grosso do Sul), Porto Velho (Rondônia), Parque Estadual do rio Doce (Minas Gerais) e da região de Paramaribo (Suriname). A população do Parque Estadual do Rio Doce apresentou $2n=52$ cromossomos. As populações de Corrientes, Miranda, Porto Velho e Suriname apresentaram $2n=48$ cromossomos, mas com distintas fórmulas cariotípicas. Considerando tal diversidade cariotípica, estes autores sugeriram que *H. unitaeniatus* poderia não se tratar de uma única espécie para o território brasileiro, mas sim de um complexo de espécies.

Posteriormente, Diniz e Bertollo (2003) analisaram, através de técnicas de citogenética clássica e molecular, três populações de *H. unitaeniatus*, sendo duas provenientes da bacia do Alto Paraná ($2n=48$) e uma do São Francisco ($2n=52$). O mapeamento físico dos genes ribossomais 18S evidenciou

a presença de RONS múltiplas, enquanto que a FISH com sonda de DNAr 5S demonstrou sítios alocados na região pericentromérica de cromossomos meta/submetacêntricos nas três populações. Entretanto, houve variação na quantidade de sítios encontrados entre as populações. Estes dados corroboram com Giuliano-Caetano et al. (2001) na hipótese de que *H. unitaeniatus* se trata, na verdade, de um complexo de espécies.

Em uma análise realizada em uma população proveniente do rio da Prata, bacia do São Francisco, foi encontrada variação intra e inter-individual relacionada ao número diplóide, sendo detectada na mesma população, $2n=50$, $2n=51$ e $2n=52$ cromossomos, além da conseqüente variação na morfologia dos cromossomos e nas fórmulas cariotípicas (Diniz e Bertollo, 2006).

Outras três populações de *H. unitaeniatus* provenientes de localidades distintas (rio Miranda – MS, rio Paraná – MS e rio Mogi-Guaçu – SP) foram analisadas recentemente. O número diplóide encontrado foi igual para as três populações ($2n=48$), contudo foi verificado um padrão distinto na fórmula cariotípica e número fundamental entre elas (Da Rosa et al. 2012).

1.5. Considerações gerais sobre complexo de espécies em peixes

Algumas espécies de peixes apresentam-se semelhantes morfológicamente, contudo apresentam grande variabilidade no que se refere ao seu genoma, desse modo muitos grupos estão sendo caracterizados como complexo de espécies.

O termo complexo de espécie foi proposto por Moreira-Filho e Bertollo (1991), com base no estudo de populações de *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) provenientes de riachos de diferentes bacias ou de uma mesma bacia. A análise realizada demonstrou grande diversidade tanto em relação a caracteres morfológicos quanto cromossômicos, como número diplóide, morfologia cromossômica e distribuição de heterocromatina, o que levou os autores a proporem que se tratasse não de uma única

espécie, mas sim de um complexo de espécies de *A. scabripinnis*. Bertaco e Lucena (2006) consideram 17 espécies fazendo parte do complexo *A. scabripinnis*, entretanto, baseado em estudos de diferentes populações de *Astyanax* provenientes de cabeceiras de rios, Vicari et al. (2008a) sugerem que este número seja possivelmente subestimado.

Ainda dentro do gênero *Astyanax*, outras espécies como *A. fasciatus* (Cuvier, 1819), *A. aff. fasciatus* Cuvier, 1819 e *A. altiparanae* Garutti & Britski, 2000 também são consideradas como complexos, sendo morfologicamente muito semelhantes e cariotipicamente distintas (Fernandes e Martins-Santos, 2004, Artoni et al. 2006).

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824), pertencente à família Heptapteriade, apresenta um número diplóide conservado com 58 cromossomos, contudo a presença/ausência de diferentes tipos de cromossomos B, variabilidade nas fórmulas cariotípicas e na localização de sítios de DNAr sugere que este grupo também se trate de um complexo de espécies (Garcia et al. 2010; Martinez et al. 2011).

Para *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), existem vários indícios de que o grupo se trate de um complexo de espécie (Carvalho, 2011). Variações em proporções corporais e padrão de coloração são comumente observados (Oyakawa et al. 2005). Além disso, apesar de apresentar um número diplóide constante ($2n=68$), várias fórmulas cariotípicas são relatadas entre diferentes populações e (Artoni e Bertollo, 1996; Alves et al. 2006) e até mesmo para populações muito próximas (Endo, 2006).

Dentre os Gymnotiformes, *Eigenmannia* (Jordan & Evermann, 1896) possui padrões morfológicos bastante complexos, além de vários problemas taxonômicos, sugerindo que este gênero seja na realidade um complexo de espécie (Moysés et al. 2010). E ainda de acordo com Campos-da-Paz (1997) é plausível acreditar que as espécies *E. virescens* (Valenciennes, 1836), *E. trilineata* López & Castello, 1966 e *E. microstoma* (Reinhardt, 1852) constituam um complexo de espécies difícil de distinguir baseando-se somente em caracteres morfológicos. Já para *Gymnotus* Linnaeus, 1758, G

carapo Linnaeus, 1758 apresenta alta variabilidade cariotípica, com número diplóide variando de $2n=42$ a $2n=54$ cromossomos, o que pode revelar-se em espécie distintas alocadas dentro do complexo de espécie *G. carapo* (Milhomem et al. 2008).

Para *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), Kullander (1998), propôs baseados tanto em caracteres morfológicos quanto moleculares, que a espécie se trate na verdade de um complexo. Uma revisão citogenética realizada por Feldberg et al. (2003) corrobora com a hipótese da existência de espécies crípticas para este grupo.

Para Erythrinidae, tanto *E. erythrinus* quanto *H. malabaricus* vem sendo considerados como complexo de espécies, devido a variabilidade encontrada no número diplóide e principalmente na ausência e presença de sistemas de cromossomos sexuais em ambas espécies (Bertollo et al. 2000 e 2004). Para *H. unitaeniatus*, Giuliano-Caetano et al (2001) sugeriram que o grupo não se tratava de uma única espécie para território brasileiro, devido a variação estrutural e numérica ($2n$) encontrada em diferentes populações. Estudos posteriores complementam a idéia de que esta espécie realmente se trate de um complexo de espécies (Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012).

1.6. Aspectos gerais sobre DNAs repetitivos

O genoma de organismos eucariotos é constituído, em grande parte, por DNA repetitivo, que são segmentos de DNA de tamanhos variados que se repetem de dezenas a milhares de vezes no genoma. Este DNA pode ser classificado em codificador, com funções biológicas bem definidas, e não codificador cujo conjunto de seqüências se encontra dispersa no genoma ou se repetem *em tandem* (Griffiths et al. 2006).

As seqüências que se repetem *em tandem* são subdivididas de acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, as quais são classificadas em DNA microsatélite, minisatélite e satélite (Epplen e Epplen-Haupt, 2002).

Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) geralmente contém de 1 a 6 pares de base (pb), repetidas de 5 a 100 vezes em cada locus (Epplen e Epplen-Haupt, 2002). São frequentemente distribuídos ao acaso pelo genoma e possuem elevado grau de polimorfismo, sendo que devido a essa alta variabilidade, seu uso como marcador molecular tem crescido consideravelmente, sendo úteis na caracterização de diferentes populações (Martins et al. 2011). Os microsatélites participam da organização da cromatina, replicação e recombinação do DNA e regulação da atividade gênica (Li et al. 2002).

Minisatélites possuem de 9 a 100 pb e apresentam-se repetidos no genoma de 2 a centenas de vezes por locus (Epplen e Epplen-Haupt, 2002). Para muitas classificações de seqüências *em tandem*, o DNA telomérico é comumente considerado um minissatélite (Fajkus et al. 2008). Telômeros são seqüências de DNA encontrados na região terminal dos cromossomos (McEachern et al. 2000) e sua função básica é manter a integridade e estabilidade cromossômica sendo conservada em organismos eucariotos (Blackburn, 2001). Todos os vertebrados apresentam esse tipo de repetição de seqüência $(TTAGGG)_n$. A utilização desse tipo de seqüência vem sendo importante na detecção de rearranjos em diversos grupos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas onde pode ser detectada a presença de ITS (Interstitial Telomeric Sequences).

DNAs satélites são seqüências maiores e possuem de 100 a 1000 pb presentes em até 10^7 cópias por genoma (Epplen e Epplen-Haupt, 2002). Na maioria dos casos, essas regiões se apresentam compactas durante o ciclo celular e com inatividade transcricional (Beridze, 1986; Vicari et al. 2008b), além de estarem preferencialmente alocadas na região centromérica e pericentromérica dos

cromossomos (Corradini et al. 2007; Rossi et al. 2007). Contudo, há descrição desse tipo de DNA em região telomérica e intersticial (Adega et al. 2007; Meles et al. 2008). Ocasionalmente, alguns genes podem ser encontrados intercalados com essas regiões sem que ocorra sua inativação (Pimpinelli et al. 1986; Lohe e Hilliker, 1995). Vale ressaltar que estas definições das diferentes classes de DNA repetitivos *em tandem* ainda são controversas na literatura.

Outra classe de DNAs organizados em *tandem* é composta por famílias multigênicas. A denominação família multigênica é utilizada para indicar um grupo de DNA com bastante similaridade estrutural e funcional, que são descendentes de um gene ancestral comum (Nei e Rooney, 2005). Entre os exemplos mais comuns de famílias multigênicas estão os genes de histonas e os DNA ribossomais (Martins et al. 2011).

As histonas são codificadas por famílias que variam entre 100 e 1000 genes (Griffiths et al. 2006). São classificadas em histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 e estão envolvidas na compactação do DNA para formação do nucleossomo. A estrutura dessas proteínas é altamente conservada, principalmente a H3 e H4, entre as diversas classes de animais, embora variações já tenham sido encontradas (Martins et al. 2011).

As seqüências de DNA ribossomais (DNAr) são amplamente utilizadas, e, na grande maioria dos eucariotos, são organizadas *em tandem* em dois grupos distintos: DNAr 45S e DNAr 5S. O arranjo maior é formado pelo DNAr 45S que é formado pelos genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5,8S e 28S. E o outro arranjo, DNAr 5S, é formado pelas seqüências de genes que transcrevem o rRNA 5S, e é transcrita por uma seqüência de aproximadamente 120 pb, sendo altamente conservada (Martins et al. 2011).

As seqüências dispersas são compostas por elementos transponíveis que se diferenciam de outras seqüências devido a sua capacidade de movimentação entre distintas regiões do genoma. Desse

modo, são classificadas em transposons, os quais se propagam a partir de moléculas de DNA, e retrotransposons, que necessitam da ação de uma transcriptase reversa para se propagarem. Estes últimos são subdivididos em duas categorias de seqüências de transposição: os longos elementos intercalares (LINEs – Long Interspersed Elements) e os elementos curtos intercalados (SINEs – Short Interspersed Elements) (Griffiths et al. 2006).

Muito se sabe sobre elementos repetitivos em diferentes classes de organismos. No caso de humanos, 98% do genoma é constituído por elementos não codificantes, e aproximadamente 45% destes são diferentes tipos de elementos transponíveis (Subramanian et al. 2003). Todas as classes de elementos transponíveis são encontradas no genoma de peixes (Volf et al. 2003) e a análise de seqüências de DNA repetitivos vem sendo cada vez mais utilizadas neste grupo, pois levam a dados consistentes, que ajudam na melhor compreensão da evolução e mapeamento de genomas de determinadas espécies (Ferreira et al. 2011), auxiliam na elucidação de relações filogenéticas (Teixeira et al. 2009) e problemas taxonômicos (Blanco et al. 2011), diversificação e evolução de cromossomos sexuais (Vicari et al. 2008c) , origem de cromossomos B (Jesus et al. 2003), diferenciações populacionais (Martinez et al. 2011), relações biogeográficas (Vicari et al. 2005), entre outros.

Em *H. unitaeniatus*, os estudos com seqüências repetitivas são escassos e somente as seqüências de DNA ribossomais (18S e 5S) foram utilizadas (Diniz e Bertollo 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012) para o mapeamento físico em seu genoma. Visto que as seqüências de DNA satélites são bastante homogêneas dentro de uma mesma espécie, mas evoluem de forma muito rápida, podendo ser diferentes mesmo entre espécies intimamente relacionadas (Singer, 1982), alguns elementos repetitivos já descritos na literatura serão procurados no genoma de *H. unitaeniatus* podendo auxiliar nas problemáticas que o envolvem.

1.7. Caracterização dos locais de estudo

A superfície global é constituída por cerca de 70% de água, a qual corresponde ao recurso natural de maior abundância. 97,5% desse total correspondem a oceanos e mares, e apenas 2,5% são de água doce, sendo que, apenas uma pequena fração dessa água é encontrada em rios e lagos (Rebouças, 2008). O Brasil é dotado de uma vasta e densa rede hidrográfica, possuindo 12% do total mundial de água doce e representando 53% da produção de água doce do continente americano.

Bacia do rio Amazonas

Com 5.825 km, o rio Amazonas é o terceiro maior do mundo em extensão. Sua nascente está localizada a 5.300 metros de altitude, na montanha Nevado Mismi, nos Andes peruanos, com o nome de Vilcanota. Recebe ainda outras denominações antes de chegar ao Brasil, onde passa a se chamar Solimões, e a partir da sua confluência com o rio Negro, recebe o nome de Amazonas. No Brasil seus principais tributários são o Iça, o Japurá, o Negro, o Trombetas e o Jarí na margem esquerda, e o Juruá, o Purus, o Madeira, o Tapajós e o Xingu, na margem direita (Amazônia Legal, 2011).

A bacia Amazônica é considerada a maior do mundo, com uma área de aproximadamente 7 milhões de km². Ocupa 2/5 da América do Sul e 5% da superfície terrestre, sendo que 72% de sua área estão localizados em território brasileiro (IBGE, 2011). Os 37% restantes de área da bacia estão distribuídos entre os territórios do Peru (16%), Bolívia (12%), Colômbia (5,7%), Equador (2,4%), Venezuela (0,7%) e Guiana (0,2%). Dentro do território brasileiro, a bacia Amazônica abrange sete estados: Amazonas, Amapá, Acre, Roraima, Rondônia, Mato Grosso e Pará. Em relação a sua ictiofauna, os dados ainda são incompletos, mas já foram registradas mais de 1.300 espécies, com predominância de Characiformes e Siluriformes (Lowe-McConnel, 1999).

Bacia do rio Araguaia-Tocantins

A bacia Araguaia-Tocantins drena uma área de 918.822 km², 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 a do Amazonas. Da área total de drenagem, 379.935 km² correspondem à bacia do rio Tocantins, 385.060 km² à bacia do rio Araguaia, além das bacias dos rios Pará e Pacajá (62.899 km²) e as bacias dos rios Acará e Guamá (90.928 km²) (ANA, 2010).

O rio Araguaia tem sua nascente no limite sul da divisa entre os estados de Mato Grosso e Goiás, em uma altitude de 850 metros. Próximo a essa região partem duas grandes bacias hidrográficas brasileiras: a bacia do Paraná-Paraguai e a do Araguaia-Tocantins. Em uma região de aproximadamente 30 km de chapadões, na Serra dos Caiapós, existem pequenos afluentes de ambas as bacias hidrográficas (Borges, 1987). Segundo Innocêncio (1989), o rio Araguaia percorre 2115 Km e pode ser considerado um rio de planície, característica que pode ser atribuída a horizontalidade de grande parte das elevações da região Centro-Oeste. Desse modo, suas águas podem ser consideradas relativamente calmas, caso contrário ao que ocorre com as águas do rio Tocantins, que é seu principal afluente e caracteriza-se, antes da confluência com o Araguaia, pela presença de corredeiras e cachoeiras.

Aproximadamente 300 espécies de peixes já foram identificadas nesta bacia. Há ocorrência de muitas espécies endêmicas, principalmente no seu curso superior. De maneira geral, a diversidade e abundância de peixes na bacia do Araguaia diminuem da foz em direção as cabeceiras, o que se relaciona principalmente à ausência de áreas de inundação (IBAMA, 2010).

Bacia do rio Paraguai

O rio Paraguai é um dos mais importantes rios de planície do Brasil, sendo superado apenas pelo Amazonas. Sua nascente está situada na Serra de Araporé, encosta meridional da Serra dos Parecis em

Mato Grosso. Até sua confluência com o rio Paraná, ele percorre 2.621 km, sendo 1.683 km em território brasileiro. Com uma área de drenagem de aproximadamente 496.000 km², a maior parte encontra-se no Brasil com 358.514 km², e o restante situa-se na Bolívia e Paraguai. A bacia do rio Paraguai é subdividida em duas partes: Alto rio Paraguai, que segue desde suas cabeceiras até a confluência com o rio Apa, e o Baixo rio Paraguai, que segue desde esse ponto até a confluência com o rio Paraná. A ictiofauna do Alto e Baixo rio Paraguai difere ligeiramente, fato que pode ser explicado pelo antigo isolamento da porção superior (Alto rio Paraguai) desta bacia com o restante da bacia do Paraná até o Holoceno, quando ocorreu a formação de um canal de conexão entre essas duas regiões.

A porção do Alto rio Paraguai engloba a região do Pantanal, que é uma extensa planície aluvial e que abrange no Brasil parte dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, além de pertencer também ao Paraguai e Bolívia. Essa região está sujeita a períodos de seca (maio a setembro) e de enchentes (outubro a março). A água do rio Paraguai é caracterizada por possuir escoamento lento devido à baixa declividade apresentada pela região do Pantanal. Os afluentes mais importantes da bacia do rio Paraguai no Pantanal são: Jauru, Sepotuba, Cuiabá, São Lourenço, Itiquira, Taquari, Negro, Aquidauana, Miranda e Apa, sendo este último o limite sul do Pantanal e o início do Baixo Rio Paraguai (Resende, 2004).

Bacia do Alto rio Paraná

O Paraná é considerado o principal rio da bacia do Prata, sendo o segundo maior em extensão da América do Sul e o décimo maior do mundo com 4.695 km (Agostinho et al. 2004). Formado pela junção do rio Grande e Paranaíba percorre cerca de 3.809 km desde sua nascente na Serra da Mata da Corda (MG) até sua desembocadura no rio da Prata, drenando uma área que corresponde a 10,5% do território brasileiro (Agostinho e Júlio Jr., 1999).

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. O Alto rio Paraná corresponde aproximadamente o primeiro terço da bacia do rio Paraná e está situado inteiramente em território brasileiro, com exceção de uma área dentro do reservatório de Itaipu, o qual faz fronteira com o Paraguai (Agostinho et al. 2004).

Em relação a ictiofauna da bacia do Alto rio Paraná, 310 espécies de peixes já foram descritas, alocadas em 11 ordens e 38 famílias, sendo que 80% desses peixes são de Siluriformes e Characiformes (Langeani et al. 2007). De acordo com Graça e Pavanelli (2007), a presença de *H. unitaeniatus* na região do Alto Paraná é decorrente de duas hipóteses: introdução acidental por ser utilizado como isca-viva na pesca artesanal ou por ter obtido sucesso na colonização após a inundação de Sete Quedas.

Bacia do rio São Francisco

A bacia do rio São Francisco é a terceira maior entre as bacias brasileiras, drenando uma área de 631.133 km², o que corresponde a 7,4 do território nacional (Sato e Godinho, 2004). É distribuída entre as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, passando pelos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (Paiva, 1982). Caracterizado como um típico rio de planalto, com algumas corredeiras, quedas e cachoeiras, o rio São Francisco 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 percorre 2.863 km (Silva et al. 2003).

O rio 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 ultimo até a cachoeira de Paulo Afonso; e o Baixo São Francisco, que vai desde a última cachoeira citada até sua foz (Sato e Godinho, 2004).

Grande parte de sua ictiofauna, que se assemelha às bacias Amazônica e do Prata, concentra-se em seus afluentes permanentes e de água com pouco material em suspensão. Cerca de 150 espécies nativas de peixes já foram identificadas nesta bacia (Sato e Godinho, 2004).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os estudos citogenéticos em populações naturais de peixes de água doce Neotropicais têm gerado importantes informações sobre modificações da estrutura cromossômica de populações presentes em diferentes bacias hidrográficas, além de fornecer valiosos subsídios para a citotaxonomia (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Souza et al. 1995). Os DNAs repetitivos vêm sendo amplamente utilizados para o mapeamento físico cromossômico e vêm contribuindo de forma significativa na elucidação de questões relacionadas à identificação de cromossomos sexuais, evolução cromossômica de grandes e pequenos grupos de peixes, como *H. unitaeniatus*, grupo amplamente distribuído nas bacias hidrográficas brasileiras e que parece apresentar uma diversidade interessante e pouco explorada.

Para gênero *Hoplerythrinus*, apenas a espécie *H. unitaeniatus* é encontrada em território brasileiro. Os estudos cromossômicos relacionados a este grupo são escassos no que se diz respeito ao mapeamento físico de sequências repetitivas, entretanto, esse grupo apresenta uma significativa diversidade, o que sugere que o grupo seja um complexo de espécies.

Com a necessidade de progredir no conhecimento científico da espécie *H. unitaeniatus*, no que diz respeito à compreensão das relações filogenéticas, taxonômicas e biogeográficas, este trabalho propõe-se realizar uma análise cromossômica comparativa entre populações desta espécie provenientes de grandes bacias hidrográficas brasileiras (Alto Paraná, Paraguai, Araguaia, São Francisco e

Amazônica). Dessa forma, objetiva-se analisar de forma abrangente exemplares de *H. unitaeniatus* dessas grandes bacias, buscando auxiliar na problemática taxonômica envolvendo esta espécie, e conseqüentemente, buscar o estabelecimento das relações biogeográficas e filogenéticas entre essas populações, utilizando como ferramenta alguns marcadores cromossômicos, tanto clássicos, quanto moleculares.

Dessa forma, os principais objetivos desse estudo são:

- Realizar uma análise comparativa entre estas populações de *H. unitaeniatus*, visando proporcionar um melhor entendimento de suas relações filogenéticas, citotaxonômicas e biogeográficas;
- Verificar se este grupo realmente se trata de uma única espécie ou de um complexo;
- Buscar compreender como elementos repetitivos já descritos na literatura, estão inseridos no genoma de *H. unitaeniatus*, podendo assim, auxiliar nas problemáticas que o envolve;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas, por metodologias de citogenética clássica e molecular, exemplares de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Fig. 1) de diferentes localidades. Para a captura dos exemplares foram utilizados anzóis e 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. No total, foram realizadas 5 coletas em localidades e bacias distintas (Fig. 2, Tab. 1). Na página 20 está apresentado um mapa da América do Sul com todos os pontos de coleta. Na página 21 encontra-se uma tabela com

todas as coletas realizadas neste trabalho e os respectivos dados referentes a cada uma dessas localidades, além do sexo, número de exemplares analisados e o número de depósito em museu.



Figura 1: Exemplar de *Hopleythrinus unitaeniatus* coletado na bacia do rio Araguaia Comprimento total: 20cm.

Tabela 1: Exemplos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* coletados e suas respectivas localidades.

Espécie	Localidade	Município	GPS	Bacia	Sexo		Depósito	Localização no Mapa
					♂	♀		
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	Rio Claro	São José do Rio Claro (MT)	56° 37' 46,2" O 13° 32' 23,4" S	Rio Arinos (rio Amazonas)	2	4	MUZUSP 109785	A
	Lagoa marginal ao córrego do Medo	São Miguel do Araguaia (GO)	56° 37' 46,2" O 13° 32' 23,4" S	Rio Araguaia	5	7	MUZUSP 109786	B
	Rio Paraguai	Porto Murtinho (MS)	21° 41' 39,8" O 57° 52' 43,89" S	Rio Paraguai	7	8	Não Depositado	C
	Rio Mogi-Guaçu	Guataporá (SP)	48° 02' 18,66" O 21° 30' 13,68" S	Alto rio Paraná	4	4	Não Depositado	D
	Lagoa marginal ao rio da Prata	João Pinheiro (MG)	42° 27' 02,5" O 17° 02' 30,8" S	Rio São Francisco	22	21	Não Depositado	E

* **MT** Mato Grosso; **GO** Goiás; **MS** Mato Grosso do Sul; **SP** São Paulo; **MG** Minas Gerais; **MUZUSP** Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

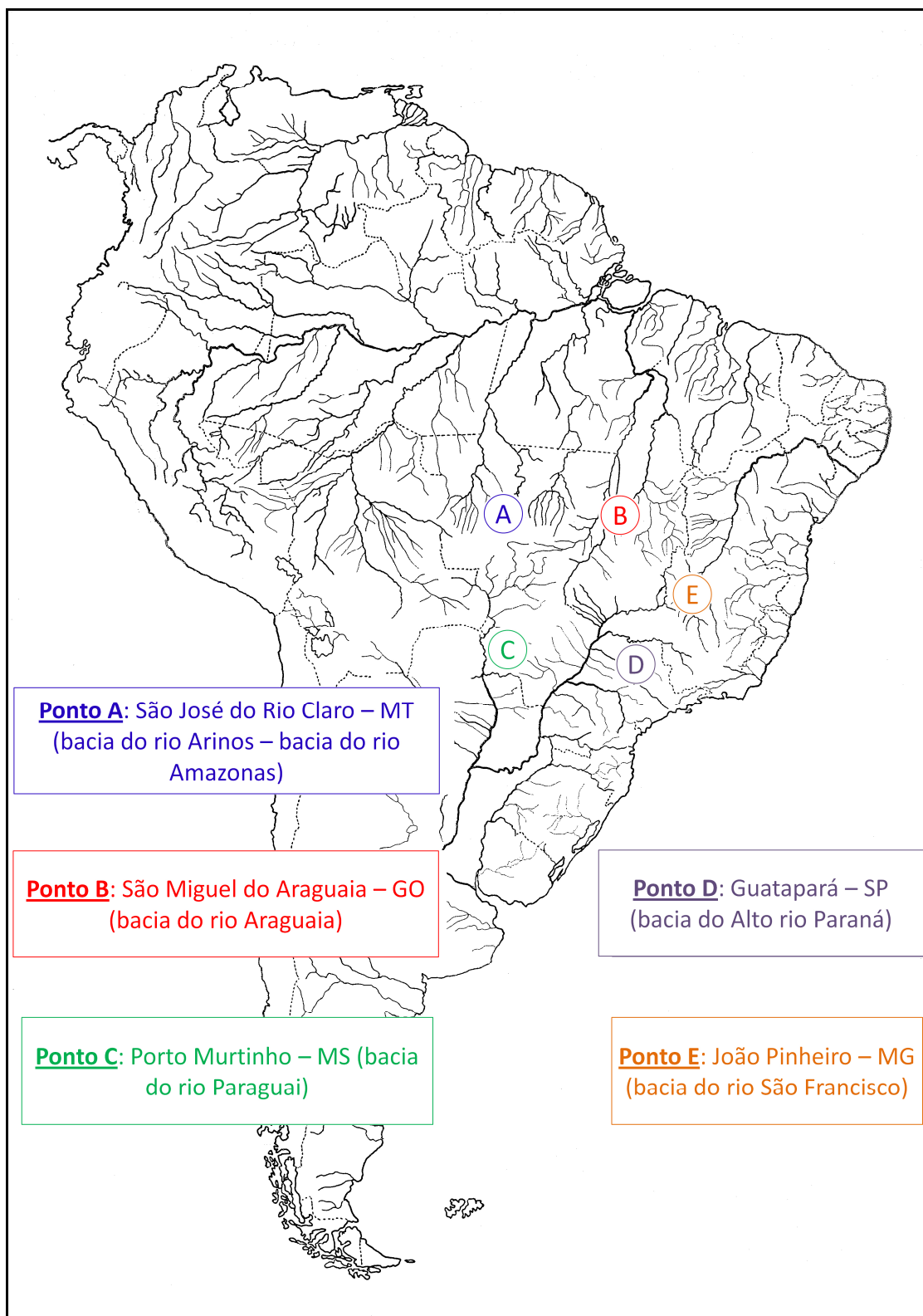


Figura 2: Mapa da América do Sul com todos os pontos de coleta.

Foram realizadas as seguintes técnicas de citogenética:

3.1. Metodologia Clássica

Tratamento “*in vivo*”

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, órgão que possui função hematopoiética em peixes, por meio da técnica descrita por Bertollo et al. (1978):

Foi injetado em cada espécime, intra-abdominalmente, uma solução aquosa de Colchicina 0,025%, na proporção de 1ml/100g de peso. Posteriormente, os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos. Decorrido esse tempo, os espécimes foram anestesiados com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e sacrificados, e porções do rim foram retiradas. O material foi lavado em solução hipotônica (KCl 0,075M), sendo transferido para pequenas cubas de vidro contendo cerca de 10ml desta mesma solução. O material foi bem fragmentado, com o auxílio de pinças de dissecação, sendo completado 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, esta suspensão foi incubada a 36-37°C, durante 20 minutos. O material foi ressuspendido cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a suspensão obtida foi 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 - 800rpm, descartando-se o material sobrenadante com pipeta Pasteur. Foram adicionados, vagarosamente, 5 - 7ml de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador, misturando bem o material. Posteriormente o material foi acondicionado em tubos de plásticos tipo Ependorff e guardado no refrigerador.

Tratamento “*in vitro*”

Alternativamente, os cromossomos foram obtidos segundo o protocolo descrito por Foresti et al. (1993), no qual fragmentos do rim foram colocados em 10mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrífuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, foi adicionada 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 foram adicionados 10ml 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, foram adicionadas cerca de 6 gotas de fixador (metanol : ácido acético - 3 : 1), misturando-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 10ml de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Nova centrifugação foi realizada, por 10 minutos, e a fixação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material foi diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular não muito concentrada e nem muito diluída. Posteriormente o material foi acondicionado em tubos de plásticos tipo Ependorff e guardado no refrigerador.

Método alternativo para a obtenção cromossomos em peixes

Os cromossomos mitóticos também foram obtidos segundo a técnica descrita por Blanco et al. (2012).

Inicialmente, os espécimes foram submetidos ao tratamento convencional colchicina (injeção intra-abdominalmente de solução 0,025%; 1 ml por 100g de massa corporal) e mantidos vivos por 30 -

45 min. Em seguida, foram anestesiados com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e sacrificados. O rim anterior foi removido e dissociado em 8 ml de solução de hipotônico (KCl 0,075 M). Após esta incubação, 2 ml de fixador (3 metanol :1ácido acético glacial) foram adicionados, e o material foi homogeneizado. Após o material ser homogeneizado, os tubos contendo a suspensão foram fechados e mantidos em geladeira por 72 horas. Após o decorrer desse tempo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 500 - 800rpm, descartando-se o material sobrenadante com pipeta Pasteur e posteriormente seguiu os passos comumente usados para fixação. Foram adicionados, vagorosamente, 5 - 7mL de fixador, deixando escorrer através das paredes do tubo. O material foi novamente homogeneizado com auxílio da pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador, misturando bem o material. Posteriormente o material foi acondicionado em tubos de plásticos tipo Ependorff e guardado no refrigerador.

Indução ao aumento do número de mitoses e suspensão de levedura

Para se obter uma melhor qualidade na análise cromossômica, fez-se necessário a obtenção mais consistente de células metafásicas, tanto em qualidade como em quantidade. Uma vez que o rim anterior possui função hematopoiética, ou seja, produz células sanguíneas, tanto as de defesa como as de transporte de O_2/CO_2 , foi utilizado o aumento na frequência de mitoses nas células de defesa através de uma suspensão de levedura (Cavallini e Bertollo, 1988).

Injetou-se intraperitonealmente suspensão de levedura (0,5 gramas de fermento de padaria + 1,5 gramas de dextrose + 6 ml de H_2O) na proporção de 1 ml/ 100 gramas de peso animal durante 48 horas, após esse tempo o material foi processado para a preparação de cromossomos mitóticos.

Preparo de lâminas

Sobre uma lâmina limpa pingou-se 1 - 3 gotas de suspensão celular, deixando-a secar ao ar. Em seguida corou-se a lâmina com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), pH = 6,8, por 7 minutos.

Determinação de heterocromatina

Para a determinação de heterocromatina (bandas-C) foi adotado o procedimento básico descrito por Sumner (1972). Primeiramente a lâmina foi tratada com HCl 0,2N por 11 minutos a temperatura ambiente. A lâmina foi lavada em água corrente e seca ao ar. Em seguida a lâmina foi colocada em solução aquosa de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5% a 42°C durante 2 minutos e em seguida foi mergulhada três vezes em HCl 0,2N e lavada em água corrente, secando ao ar. Em seguida, colocou-se a lâmina em solução salina 2xSSC por 30 minutos. Por último, lavou-se a lâmina em água corrente, deixando secar ao ar e corando com 0,7 µL iodeto de propídeo (50 µg/mL) e 20 µL de anti-fading (Lui et al. 2012).

Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) - Impregnação por prata

Na técnica de impregnação pelo nitrato de prata, segundo o procedimento descrito por Howell e Black (1980), a prata se associa com as proteínas nucleolares, e marca somente as RONs ativas na interfase precedente. Colocou-se sobre uma lâmina previamente preparada 3 gotas de solução aquosa de gelatina (1 grama de gelatina incolor + 50 ml de H_2O + 0,5 ml de ácido fórmico) e adicionou-se sobre cada gota duas gotas de AgNO_3 . Em seguida, cobriu com uma lamínula e colocou em estufa a 60°C durante 8 minutos. Após isso a lamínula escorreu debaixo de água corrente e secou ao ar. A lâmina foi observada ao microscópio.

Estudos cariotípicos

As preparações foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão. Com a utilização de uma câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50, as imagens selecionadas foram capturadas através do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetics).

Após a captura, os homólogos foram pareados e dispostos em grupos (metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico), seguindo a classificação proposta por Levan et al. (1964) onde o limite de 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, subtlocêntrico (st);

RB= maior que 7,00, acrocêntrico (a).

Na determinação do número fundamental (NF), os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos foram considerados com dois braços cromossômicos e os cromossomos acrocêntricos com um braço.

3.2. Metodologia Molecular

Extração de DNA total com fenol:clorofórmio

A extração de DNA total foi realizado segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. 2001. Inicialmente pequenos pedaços de tecido foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 700µL de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris-HCl 0,01M; Proteinase K – 100µg/ml e SDS 0,1%). As amostras foram então incubadas a 55°C por 2 horas. Foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o material foi agitado

suavemente por 20 minutos. Centrifugou-se o material a 13.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. Foram acrescentados NaCl 1M e 2 volumes de etanol 100% gelado. O material foi agitado suavemente, posteriormente centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 200 μ L de álcool 70% gelado e centrifugou-se o material a 10.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Secou-se o DNA em estufa a 37°C e este foi resuspenso em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM). Acrescentou-se 1 μ l de RNase (concentração final = 100 μ g/ml).

Após a extração do DNA total foi realizada a sua quantificação em gel de agarose 1% com auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A estimativa da quantidade de DNA foi feita por meio de comparação entre o tamanho e a intensidade da banda do marcador com o das amostras.

Dupla e Simples Hibridização *in situ* Fluorescente, (protocolo de Pinkel et al. 1986)

A dupla e simples hibridização *in situ* fluorescente foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações. Este protocolo foi utilizado para realizar as hibridizações com sondas de DNA ribossômicas 5S e 18S (dupla hibridização), histonas H3 e H4, sequência telomérica (TTAGGG)_n e sequência de microsatélite (GATA)_n (simples hibridização).

Obtenção e marcação das sondas

Para todos os trabalhos foram utilizadas as sondas de DNAr 18S de *Prochilodus argenteus*, obtidas por Hatanaka e Galetti Jr (2004), e de DNAr 5S de *Leporinus elongatus* obtidas por Martins et al. (2001).

As outras classes de DNAs repetitivos foram obtidas através de reações de PCR com primers específicos. O DNA telomérico (TTAGGG)_n foi amplificado utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991); a sequência de microsatélite (GATA)_n foi obtida com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Epplen et al. 1982.); a sequência da histona H3 foi obtida pelos primers H3F (ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC) e H3R (ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC) (Colgan et al. 1998) e a H4 foi obtida pelos primers H4F2Er (GTIACIGTCTTSCKYTTGGCGTGCTC) e H4F2s (TSCGI-GAYAACATYCAGGGIATCAC) (Pineau et al. 2005).

A edição das sequências de H3 e H4 foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999). Foi utilizado o BLAST (Altschul et al. 1990) na identificação de similaridade destas sequências.

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16 – dUTP (para as sondas de DNAr 18S, telomérica e GATA) e digoxigenina 11 dUTP (para as sondas de rDNA 5S, H3 e H4) (Roche). O produto desta reação foi precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a –20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, descartado o sobrenadante, e deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37 °C.

Dupla hibridização e detecção de sinal

As lâminas 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 6µL de sonda 1, 6µL de sonda 2, 30µL de formamida (concentração final de 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC, por lâmina. Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C,

em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15 % em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20 0,05 % / 4 x SSC, por 5 minutos, incubadas em 90 µL de tampão NFDM a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e lavadas duas vezes com Tween 20 0,05 % / 4 x SSC, cinco minutos cada. 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-avidin) conjugada e 5 µl de anti-digoxigenina rodamina conjugada, permanecendo por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas três vezes em Tween 20 0,05 % / 4 x SSC, cinco minutos cada. Em seguida realizou-se a desidratação em série de etanol a 70 %, 85 % e 100 % à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos serão contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifading”.

Simple hibridização e detecção de sinal

As lâminas 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 6µL de sonda, 1,6µL de H₂O Mili-Q, 30µL de formamida (concentração final de 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC, por lâmina. Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µL da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC a 37°C, por 6 minutos cada e posteriormente incubadas em 1xPBS (200ml 20xSSC, 6ml Tween 100, 10g not fat dry milk, 800ml de água destilada). A detecção do sinal foi realizada com 3,5µL de avidina-FITC (diluição de 1:100 - Sigma) e 27µL de tampão NFDM por 30

minutos a 37°C em câmara úmida, por lâmina. Após três lavagens com 1xPBS a 45°C por 4 minutos cada, foram realizados 3 ciclos de amplificação do sinal utilizando uma solução de anti-avidina-biotina conjugada (2µL de anti-avidina e 38µL de 1xPBD) por lâmina, durante 20 minutos a 37°C. Após três lavagens com 1xPBS a 45°C por 4 minutos, cada lâmina foi tratada com 3,5µL de FITC (1:100) + tampão C, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens finais, os cromossomos foram corados com DAPI (0,2µg/ml) diluído em uma solução “antifading”.

Simple Hibridização *in situ* Fluorescente (protocolo de Kubat et al. 2008)

A simples hibridização *in situ* fluorescente, segundo o protocolo de Kubat et al. 2008, foi utilizada para realizar as hibridizações com as sondas dos microsátélites.

Obtenção e marcação das sondas

Foram utilizados como sondas cinco oligonucleotídeos enriquecido com microsátélites: (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀, com marcação direta Cy3 na extremidade 5' durante a síntese. Esses oligonucleotídeos foram obtidos comercialmente pela Sigma.

Hibridização e detecção de sinal

As lâminas 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 2 minutos e 30 segundos, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica de etanol 50% e 100% por 2 minutos cada. O mix de hibridação consistiu de 2µL de sonda a 100ng/µL, 12,5µL de formamida, 5µL de sulfato de dextrano 50% e 2,5µL 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 em 2xSSC e 1xSSC por

períodos de 5 minutos cada. As lâminas foram então desidratadas em série alcoólica de etanol 50%, 70% e 100% por 5 minutos cada e os cromossomos foram corados com DAPI (0,2µg/ml) diluído em uma solução “antifading”.

Análise dos resultados

As preparações de citogenética molecular foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtros apropriados. As imagens selecionadas foram capturadas através do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic), com câmera acoplada a um microscópio Olympus BX50.

4. REFERÊNCIAS (Introdução, Materiais e Métodos)

ADEGA, F.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H. Constitutive heterochromatin characterization of White-lipped and Collared peccaries (Tayassuidae). **Journal Genetics**, v.86, p.19-26, 2007.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr., H. F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-MC-CONNELL, R. H. (Ed.) **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 535p. 374-399.

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin, Brasil. In: CAROLSFELD, J. et al. (Ed.) **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 2004. 380p. 19-98.

ALVES, A. L. et al. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v.128, p.1-9, 2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

AMAZÔNIA LEGAL. Disponível em: <<http://www.povosdaamazonia.am.gov.br>>. Acesso em: 01/07/2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Plano Estratégico de Recursos Hídricos das Bacias dos rios Tocantins e Araguaia**. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/GestaoRecHidricos/PlanejHidrologico/pbhta/apresentacoes/2Reuniao25-09-06/Documentos/unidades/Apresentacao.PDF>>. Acesso em: 10/06/2010

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies in Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, v.49, p.81-90, 1996.

ARTONI R. F. et al. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the Upper rio Tibagi basin (Paraná, Brasil). **Neotropical Ichthyology**, v.4, p.197-202, 2006.

BERIDZE, T. **Satellite DNA**. Berlin: Springer, 1986. 149p.

BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from Eastern Brazil with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v.4, p.53-60, 2006.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, n.2, p.103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v.8, p.603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. et al. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity**, v.93, p.228-233, 2004.

BERTOLLO, L. A. C. Chromosome evolution in the neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: PISANO, E. et al. (Ed.) **Fish Cytogenetics**. USA: Science Publishers, 2007. 518p. 195-211.

BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v.106, p.661-673, 2001.

BLANCO, D. R. et al. Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n.2, p.361-368, 2010.

BLANCO, D. R. et al. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, p.71-78, 2011.

BLANCO, D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v.81, p.351-357, 2012.

BORGES, D. R. **Rio Araguaia, corpo e alma**. São Paulo: IBRASA, 1987. 403p.

BRASSESCO, M. S. et al. Comparative cytogenetics studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.293-301, 2004.

CAMPOS-DA-PAZ, R. **Sistemática e taxonomia dos peixes elétricos das bacias dos rios Paraguai, Paraná e São Francisco, com notas sobre espécies presentes em rios costeiros do leste do Brasil (Teleostei: Ostariophysi: Gymnotiformes)**. 1997. 336p. Tese (Doutorado em Ciências - Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

CARVALHO, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. 2011. 113p. Tese (Doutorado em Ciências – Genética) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CAVALLINI M. M.; BERTOLLO L. A. C. Indução de mitoses em *Hoplias cf. malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). In: **II SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS**, 1988, Maringá, p.32.

COLGAN, D. J.; HUTCHUNGS, P. A.; BEACHAM, E. Multi-gene analyses of the phylogenetic relationships among the mollusca, annelid and arthropoda. **Zoological Studies**, v.47, n.3, p.338-351, 2008.

CORRADINI, N. et al. *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. **Heredity**, v.98, p.3–12, 2007.

DA ROSA, R. et al. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.467-475, 2012.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, v.56, n.3, p.303-311, 2003.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.453-458, 2006.

ENDO, K. S. **Análise citogenética de espécies da subfamília Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do alto Paraná.** 2006. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

EPPLEN, J. T. et al. Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.79, p.3798-3802, 1982.

EPPLEN, J. F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R. C.; OBE, G.; ATHWAL, R. S. (Ed.) **Some aspects of chromosome structure and functions.** Índia: Narosab Publishing House, 2002. 238p. 1-10.

FAJKUS, J. et al. Evolution, Composition and Interrelated Functions of Telomeres and Subtelomeres: Lessons from Plants. In: NOSEK, J.; TOMÁSKA, L. (Ed.) **Origin and Evolution of Telomeres.** USA: Landes Bioscience, 2008. 194p. 114-127.

FELDBERG, E. et al. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. 2. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**, v.36, p.372–376, 1993.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed.) **Fish Adaptation.** USA: Science Publishers, 2003. 428p. 285-308.

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E. Respiratory organs in erythrinid fishes. In: VAL, A. L.; RANDALL, D. I.; MACKINLEY, D. (Ed.) **Proceeding Of Physiology of Tropical Fishes.** San Francisco, American Fisheries Society, 1996. 141p. 93-100.

FENANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v.141, p.328-332, 2004.

FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome Mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, n.1-2, p. 64-70, 2011.

FINK, W. I.; FINK, S. V. A Amazônia central e seus peixes. **Acta Amazônica**, v.8, n.4, p.19-42, 1978.

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

GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.365-384, 2010.

GAYET, M. et al. New characoids from the upper Cretaceous and Paleocene of Bolivia and Mio-Pliocene of Brazil: phylogenetic position and paleobiogeographic implications. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v.23, p.28-46, 2003.

GIULIANO-CAETANO, L. Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (PISCES, ERYTHRINIDAE) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras. 1986. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, state of Amazonas). **Brazilian Journal of Genetic**, v.11, n.2, p.299-306, 1988.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of natural triploidy. **Brazilian Journal of Genetic**, v.13, n.2, p.231-237, 1990.

GIULIANO-CAETANO, L. et al. Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v.66, p.59-64, 2001.

GRAÇA, W.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007. v.1. 241 p.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an an-aesthetic and method of sampling intertidal rock-pool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

GRIFFITHS, J. F. et al. **Introdução à genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposion Series**, n.41, p.95-98, 1999.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p.239-244, 2004.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DE RECURSOS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Bacia Araguaia-Tocantins**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_doaraguaiaatocantins.htm>. Acesso em: 20/05/2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10/07/2011.

IJDO, J. W. et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.17, p.4780, 1991.

INNOCÊNCIO, N. R. Hidrografia. In DUARTE, A. C. (Ed.) **Geografia do Brasil. 1. Região Centro-Oeste**. Rio de Janeiro: IBGE, 1989. 267p. 73-90.

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

JUCÁ-CHAGAS, R. Air breathing of the neotropical fishes *Lepidosiren paradoxa*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Hoplosternum littorale* during aquatic hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.139, p.49-53, 2004.

KRAMER, D. L. Ventilation of the respiratory gas bladder in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (pisces, Characoidei, Erythrinidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.56, p.931-938, 1978.

KUBAT, Z. K. Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v.51, p.350-356, 2008.

KULLANDER, S. O. A phylogeny and classification of South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: MALABARBA, L. R. et al. (Ed.) **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. 603p. 461-498.

LANGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v.7, n.3, p.181-197, 2007.

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

LI, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.

LOHE, A. R.; HILLIKER, A. J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetics & Development**, v.5, p.746-755, 1995.

LOWE-MCCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 536p.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. 1993. 158p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas -Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v.87, p.433-438, 2012.

MARIANO, W. S. et al. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerthrinus unitaeniatus*) exposto ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.210-223, 2009.

MARTINEZ, J. F. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**, v.64, n.1, p.121-128, 2011.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v.44, p.903-910, 2001.

MARTINS, C. et al. **Animal Genomes Under the Focus of Cytogenetics**. New York: Nova Science Publishers, 2011. 160p.

MARTINS, N. F. et al. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): occurrence and distribution of B chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, in press.

MCEACHERN, M. J.; KRAUSKOPF, A.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and their control. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.331-358, 2000.

MELES, S. et al. The karyotype and sex chromosomes of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): a detailed characterization. **Micron**, v.39, p.559–568, 2008.

MILHOMEM, S. S. R. et al. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* specie-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). **BMC Genetics**, v.9, n.75, p.1-10, 2008.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v.14, p.331-357, 1991.

MORELLI, S.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.897-903, 2007.

MOYSÉS, C. B. et al. Cytotype-specific ISSR profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmnia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Genetica**, v.138, n.2, p.179-189, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4.ed. New York: Wiley-Interscience, 2006. 601p.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v.39, p.121-152, 2005.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R. E.; SVEN, O. K.; FERRARIS Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p. 238-240.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A. M. Review of the genus *Hypostomus* Lacepède, 1803 from Ribeira do Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, v.921, p.1-27, 2005.

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

PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra Editorial, 1982. 292p.

PINEAU, P. et al. A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.3, p.582-588, 2005.

PIMPINELLI, S. et al. The peculiar genetic organization of *Drosophila* heterochromatin. **Trends in Genetics**, v.2, p.17-20, 1986.

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

REBOUÇAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Ed.) **Águas doces no Brasil – Capital ecológico, uso e conservação**. 3.ed. São Paulo: ESCRITURAS, 2008. 750p. 1-35.

RESENDE, E. K. (2004) Migratory fishes of the Paraguay-Paraná basin excluding the Upper Paraná basin. In: CAROLSFELD, J. et al. (Ed.) **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 2004. 380p. 99-156.

ROSSI, F. et al. Cytogenetic and molecular characterization of heterochromatin. Gene models in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.175, p.595–607, 2007.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Laboratory Press, 2001. 2344p.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. Peixes da Bacia do Rio São Francisco. In: LOWE-MCCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 536p. 401-413.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. (2004) Migratory Fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J. et al. (Ed.) **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 2004. 380p. 195-232.

SCHEEL, J. J. **Fish chromosomes and their evolution**. Denmark: Interval Report of Danmarks Akvarium, 1973. 22p.

SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, v.76, p.67-112, 1982.

SILVA, A. F. et al. Determinação da Extensão do Rio São Francisco. In: **XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO**, 2003, Belo Horizonte. Anais da XI da SBSR, 393-394.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae). C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. **Cytobios**, v.83, p.273-281, 1995.

SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R. K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. **Bioinformatics**, v.19, n.6, p.681-685, 2003.

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

TEIXEIRA, W. G. et al. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.125, p.224–234, 2009.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.103-110, 2005.

VICARI, M. R. et al. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.173-179, 2008a.

VICARI, M. R. et al. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v.122, p.67-72, 2008b.

VICARI, M. R. et al. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, v.134, p.311–317, 2008c.

VOLFF J. N. et al. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes.
Trends in Genetics, v.19, p.674–678, 2003.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se divididos em três capítulos:

CAPÍTULO I: Análise citogenética de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) da na bacia do rio São Francisco: ocorrência de dois cariomorfos em simpatria e de híbridos naturais.

CAPÍTULO II: Citogética comparativa entre populações do complexo *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) proveniente de diferentes bacias hidrográficas brasileiras.

CAPÍTULO III: Mapeamento físico de diferentes classes de DNA repetitivo no genoma de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes: Erythrinidae) de diferentes bacias hidrográficas brasileiras

CAPÍTULO I

**Análise citogenética de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae)
da na bacia do rio São Francisco: ocorrência de dois cariomorfos em simpatria e de
híbridos naturais.**

RESUMO

No presente trabalho foram analisados cromossômicamente 43 exemplares de *Hoplerythrinus unitaeniatus*, através de técnicas de citogenética clássica (coloração convencional por Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de prata) e molecular (hibridização *in situ* fluorescente -FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S, provenientes de uma lagoa marginal ao rio da Prata (João Pinheiro – MG). Os números diplóides encontrados foram 50 e 52 cromossomos, demonstrando a existência de duas entidades biológicas bem definidas em simpatria. Espécimes com 51 cromossomos, os quais apresentaram três formas cariotípicas distintas, também foram encontrados, sendo caracterizados como híbridos naturais devido à correspondência entre os cromossomos destes com os dos espécimes com 50 e 52 cromossomos. Com a FISH utilizando sondas de DNAr 18S e 5S foi possível verificar a ocorrência de cromossomos marcadores característicos dos espécimes com 50 e 52 cromossomos, além da ocorrência de sítios comuns em ambos. Os espécimes com 51 cromossomos apresentaram padrões intermediários para este marcador, o que reforça a hipótese de que realmente se trate de híbridos naturais. Também foi proposta uma revisão e nova classificação para os cariomorfos de *H. unitaeniatus*.

Palavras chaves: DNAr 18S e 5S, FISH, hibridização, marcadores citogenéticos.

INTRODUÇÃO

A bacia do rio São Francisco é a terceira maior entre as bacias brasileiras, drenando uma área correspondente a 8% do território nacional. Encontra-se distribuída entre as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (Sato e Godinho, 2004). O rio São Francisco inicia seu curso no Planalto de Araxá, correspondendo às nascentes do rio Samburá, e sua foz no oceano Atlântico entre os estados de Sergipe e Alagoas, percorrendo 2.863 km (Silva et al. 2003). Existem cinco bacias hidrográficas adjacentes à bacia do rio São Francisco, separadas por divisores de águas: ao Sul confronta-se com a bacia do rio Grande, a Oeste com a do rio Paranaíba e a Leste com as bacias do rio Doce, Jequitinhonha e Pardo. Possui uma ictiofauna bastante diversa, apresentando alto grau de endemismo (36,3%) (Barbosa e Soares, 2009). Além disso, cerca de 150 espécies nativas já foram identificadas nesta bacia (Sato e Godinho, 2004).

Erythrinidae é uma família de Characiformes representada por apenas três gêneros: *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903, todos endêmicos da América do Sul, com ampla distribuição pelas bacias brasileiras (Oyakawa, 2003).

Hoplerythrinus possui três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) e *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829), sendo que somente *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829) é encontrada em território brasileiro e tem como localidade-tipo o rio São Francisco (Oyakawa, 2003). *Hoplerythrinus unitaeniatus* é considerado um grupo bastante diverso do ponto de vista cromossômico, com número diplóide variando de 48 a 52 cromossomos (Giuliano-Caetano, 1986; Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo 2003; Da Rosa et al. 2012). Além disso, seis cariomorfos distintos (A - F), baseados no número diplóide e morfologia cromossômica, são considerados válidos. Os cariomorfos A, B e E apresentam $2n=48$ cromossomos e os cariomorfos C, D

e F apresentam $2n=52$ cromossomos, todos com distintas fórmulas cariotípicas (Bertollo, 2007; Da Rosa et al. 2012).

Diniz e Bertollo (2006) analisaram uma população de *H. unitaeniatus* proveniente da bacia do rio São Francisco (município de João Pinheiro, estado de Minas Gerais, Brasil) e encontraram uma variação intra e inter-individual relacionada ao número diplóide, sendo detectada na mesma população $2n=50$, $2n=51$ e $2n=52$ cromossomos, além de variações inter e intra-individuais nas fórmulas cariotípicas. Neste contexto, os autores falam sobre a possibilidade de tais resultados serem decorrentes de hibridização entre as formas com 50 e 52 cromossomos ou devido à presença de poluentes no ambiente. Em trabalho mais recente, Da Rosa et al. (2012) classificam os espécimes com $2n=52$ cromossomos do rio São Francisco como pertencentes ao cariomorfo D e os com 50 e 51 cromossomos como subtipos (D1-D7) deste cariomorfo.

No presente trabalho, foi analisada uma população de *H. unitaeniatus* da bacia do rio São Francisco, proveniente da mesma localidade da população analisada por Diniz e Bertollo (2006). Através de técnicas de citogenética clássica e molecular, objetivou-se investigar o polimorfismo anteriormente proposto por tais autores, e testar a hipótese de coexistência simpátrica de duas formas cariotípicas distintas de *H. unitaeniatus* e a possível formação de híbridos naturais entre elas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 43 exemplares de *H. unitaeniatus* (22 machos e 21 fêmeas) provenientes de uma lagoa marginal ao rio da Prata, no município de João Pinheiro (MG), pertencente à bacia do rio São Francisco.

Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e posteriormente sacrificados. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, órgão que possui função

hematopoiética em peixes, por meio das técnicas descritas por Bertollo et al. (1978), Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). Os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5% e a morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi determinado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) como portadores de dois braços e os acrocêntricos (a) como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão de distribuição heterocromático foi determinado através do método proposto por Sumner (1972), com modificações na etapa da coloração (Lui et al. 2012). A detecção das regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) seguiu o protocolo descrito por Howell e Black (1980).

O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos foi obtido pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com sondas obtidas de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 2001), respectivamente. As sondas de DNAr 5S e 18S foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e biotina-14-dATP, respectivamente, por *nick translation*, de acordo com as especificações do fabricante (Roche Applied Science). Todos os processos de hibridização foram realizados sob alta condição de estrigência - 77% - (200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 - 7,2, a 37 °C, “overnight”). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51. O software DP2-BSW (Olympus) foi utilizado para a captura das imagens.

RESULTADOS

As análises cromossômicas dos 43 exemplares de *H. unitaeniatus* demonstraram a existência de variação inter-individual, caracterizando dois tipos de cariótipos bem definidos. Foram encontrados espécimes com $2n=50$ cromossomos (32m+14sm+4a; Fig.1a) e com $2n=52$ cromossomos

(30m+16sm+6a; Fig.1b). Nenhuma variação cromossômica intra-individual foi observada nesses espécimes. Além desses dois tipos de cariótipos, outras três formas intermediárias com $2n=51$ cromossomos e com variações na fórmula cariotípica, aqui denominadas h1, h2 e h3, foram também identificadas (Fig.1c). Os cinco tipos de cariótipos apresentaram freqüências distintas na população (Tab.1).

Tabela1: Números diplóides, fórmulas cariotípicas e respectivas freqüências observadas na população de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.

Número diplóide	Fórmula cariotípica	NF	Nº de exemplares analisados		Freqüência
			♀	♂	
2n=50	32m+14sm+4a	96	6	9	35%
2n=52	30m+16sm+6a	98	6	4	23%
2n=51 (h1)	31m+15sm+5a	97	7	5	28%
2n=51 (h2)	32m+15sm+4a	98	1	1	5%
2n=51 (h3)	31m+14sm+6a	96	1	3	9%
		Total	43		100%

***m** metacêntrico; **sm** submetacêntrico; **a** acrocêntrico, **NF** Número Fundamental

O bandamento C evidenciou blocos conspícuos de heterocromatina localizados na região pericentromérica/intersticial da maioria dos cromossomos nos espécimes com $2n=50$ (Fig. 1a) e $2n=52$ cromossomos (Fig.1b). Além disso, alguns cromossomos também apresentaram blocos heterocromáticos em posição centromérica e terminal. Os espécimes com $2n=51$ mostraram o mesmo padrão heterocromático correspondente aos demais espécimes (dados não mostrados).

A impregnação pelo nitrato de prata demonstrou AgRONS múltiplas em todos os exemplares analisados, em cromossomos não homólogos. Para os espécimes com $2n=50$, um cromossomo de cada

um dos pares 7, 24 e 25 encontraram-se ativos e, o mesmo ocorrendo nos espécimes com $2n=52$ em relação aos pares cromossômicos 24 e 25. Os espécimes com $2n=51$ mostraram um padrão de AgRONS intermediário aos dos espécimes com 50 e 52 cromossomos (em destaque, Fig.1).

A FISH com sonda de DNAr 18S mostrou 13 cromossomos portadores desses cístrons para os espécimes com 50 cromossomos (pares 4, 6, 7, 8, 24, 25 e um cromossomo do par 3) e 9 cromossomos para os espécimes com 52 cromossomos (pares 3, 5, 24, 25 e um cromossomo do par 26). Para a sonda de DNAr 5S foi verificado 8 cromossomos marcados para os espécimes com 50 cromossomos (pares 2, 6, 10 e um cromossomo dos pares 1 e 17) e 9 cromossomos marcados para os espécimes com 52 cromossomos (pares 2, 5, 9 e um cromossomo dos pares 1, 4 e 16). Foi detectado um par cromossômico sintênico para estes dois clusters de genes ribossomais (par 6 nos exemplares com 50 cromossomos e par 5 nos exemplares com 52 cromossomos). Já os espécimes com 51 cromossomos apresentaram sítios de DNAr 5S e 18S semelhantes aos verificados nos exemplares de 50 e 52 cromossomos, ocorrendo situações intermediárias em relação ao número de sítios (Fig.2).

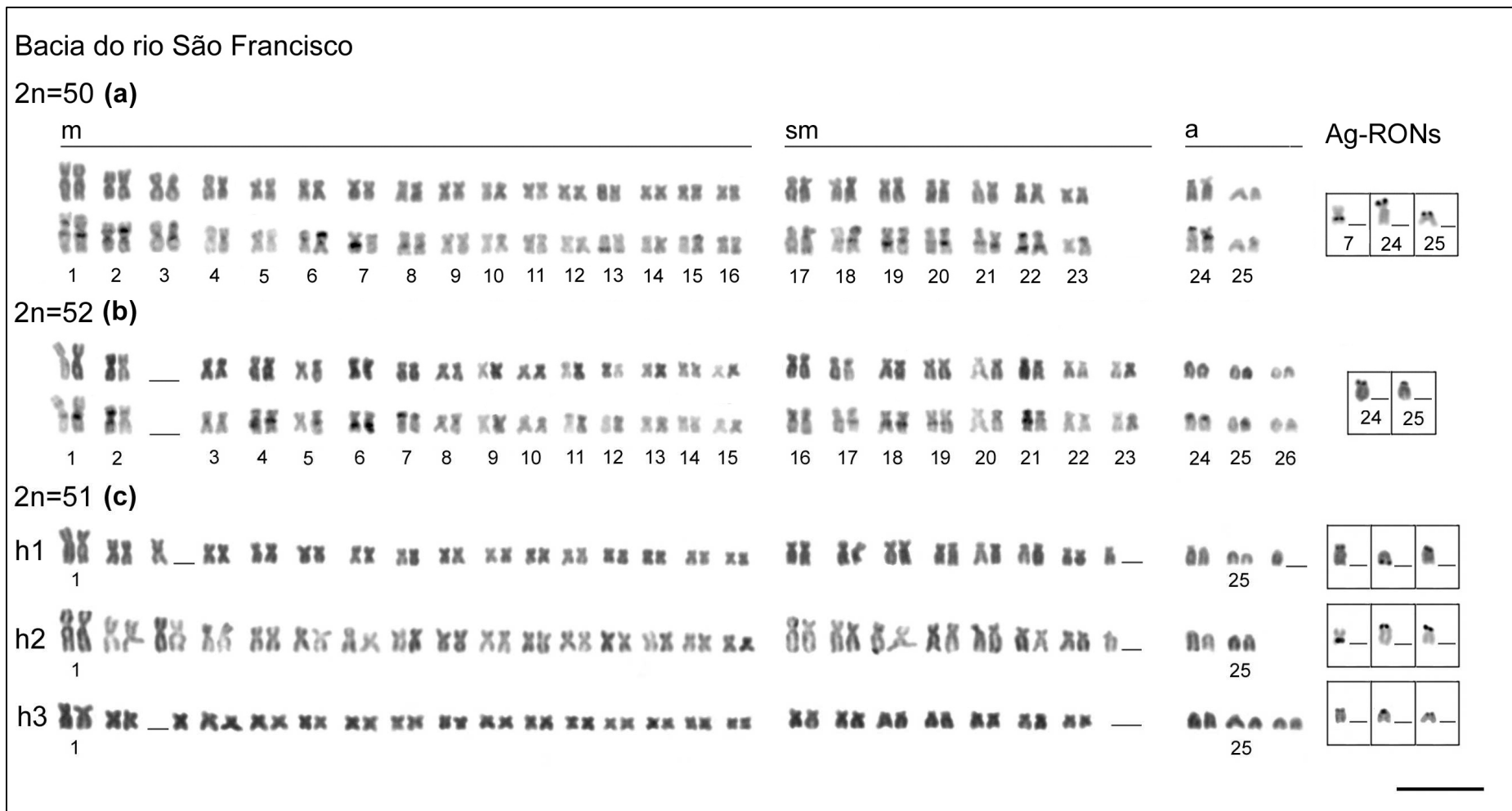


Figura 1: Cariótipos das *Hoplerhythrinus unitaeniatus* da bacia do rio São Francisco. Cariótipo corado com Giemsa e posteriormente C bandado (a - 2n=50) e (b - 2n=52). Cariótipo corado com Giemsa mostrando as três fórmulas cariotípicas encontradas nos espécimes com 2n=51 (h1, h2, h3) (c). Em destaque são apresentados os pares cromossômicos portadores da AgRONS para cada cariótipo. Barra=10µm.

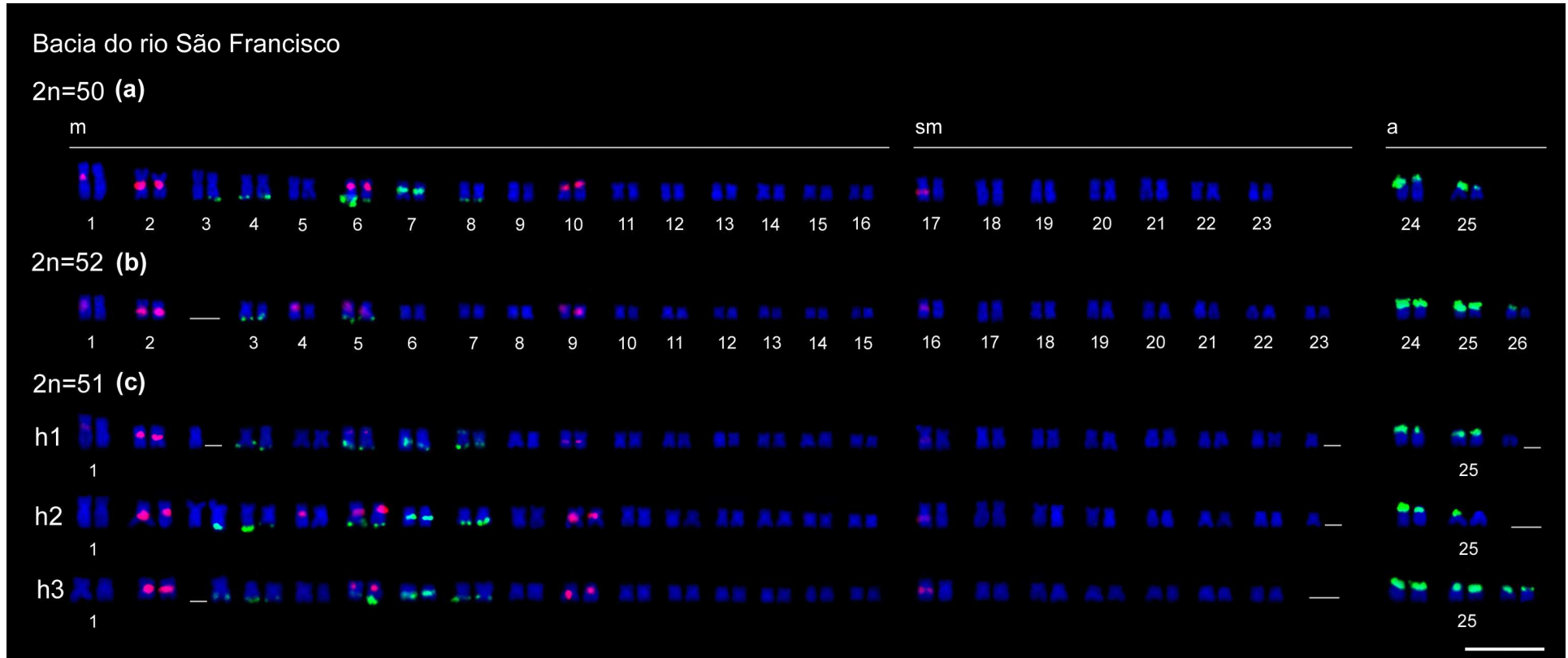


Figura 2: Cariótipos das *Hoplerhythrinu unitaeniatus* proveniente da bacia do rio São Francisco hibridados com sondas de DNAr 18S (FITC – sinal verde) e DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho). Cariótipos com 2n=50 (a), Cariótipos com 2n=52 (b), Cariótipo mostrando as três fórmulas cariotípicas encontradas nos espécimes com 2n=51 (h1, h2, h3) (c). Barra=10µm.

DISCUSSÃO

A variabilidade cariotípica existente em populações de *H. unitaeniatus* já vem sendo constatada por diversos estudos (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo, 2003; 2006; Da Rosa et al. 2012). Na população de *H. unitaeniatus* da bacia do rio São Francisco também se verifica esta variabilidade, onde espécimes com $2n=50$, 51 e 52 cromossomos foram claramente identificados.

Diniz e Bertollo (2006), analisando espécimes desta mesma localidade, encontraram variações no número cromossômico e fórmula cariotípica entre indivíduos, além de variações intra-individuais na fórmula cariotípica. A hipótese proposta por tais autores para explicar tal ocorrência coloca que formas variantes com $2n=51$ cromossomos seriam decorrentes de hibridização entre as formas com $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos e posteriores cruzamentos entre todas as variantes existentes. Entretanto, os autores afirmaram que não foi verificada uma correspondência entre os cromossomos dos indivíduos com 51 em relação aos possíveis parentais com 50 e 52.

A análise de novos espécimes realizada no presente trabalho, com aumento significativo na amostragem (43 espécimes), demonstrou através de análises clássicas de citogenética, e principalmente pela análise da citogenética molecular, que há correspondência entre os cromossomos dos espécimes com 50 e 52, com os espécimes com 51 cromossomos, podendo assim, serem tratados como híbridos naturais. Além disso, algumas características peculiares dos espécimes com 50 e 52 cromossomos podem ser observadas. Os pares cromossômicos 4, 24 e 25 portadores de sítios de DNAr 18S dos espécimes com 50 cromossomos apresentam cromossomos correspondentes nos com 52, os pares 3, 24 e 25. O mesmo pode ser observado para o DNAr 5S, através dos pares 1, 2, 10 e 17 do cariótipo com 50 cromossomos, quando comparado aos pares 1, 2, 9 e 16 do cariótipo com 52. Entretanto, o par cromossômico 3, e conseqüentemente seu sítio de DNAr 18S (presente em apenas um cromossomo do

par), encontra-se presente somente nos indivíduos com 50 cromossomos e ausente naqueles com 52, semelhante ao observado para os sítios de DNAr 18S presentes nos pares 7 e 8 (cariótipo com 50 cromossomos), correspondente aos pares 6 e 7 (cariótipo com 52 cromossomos). Para o DNAr 5S somente um sítio, presente em um cromossomo do par 4 nos espécimes com 52 cromossomos, não está presente no par equivalente nos espécimes com 50. Vale ressaltar que o par sintênico (par 6 nos espécimes com 50 cromossomos e par 5 nos espécimes com 52) mostra-se conservado para essas duas formas cariotípicas. Desta maneira, estes elementos repetitivos do genoma representam bons marcadores cromossômicos para estas duas variantes cariotípicas. Os exemplares com 51 cromossomos apresentaram condições variáveis para estes marcadores.

Considerando a similaridade verificada entre os cariótipos de 50, 51 e 52 cromossomos para maioria dos pares cromossômicos, a identificação de marcadores cromossômicos capazes de diferenciar os cariótipos com $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos, e o padrão intermediário destes marcadores para os indivíduos com $2n=51$ cromossomos, é plausível supor que esta amostragem esteja englobando duas variantes cromossômicas (50 e 52 cromossomos) em simpatria, porém com distinção bem definida, e formas intermediárias (51 cromossomos) resultantes de hibridização entre os dois citótipos definidos.

A presença de variantes (h1, h2 e h3) que requerem retrocruzamentos entre indivíduos com 51 cromossomos, e destes com exemplares portadores de 50 e 52 cromossomos, sugere que os indivíduos portadores de 51 cromossomos são férteis. Quanto maior for à introgressão, isto é, o fluxo gênico existente entre as espécies de populações híbridas (Allendorf et al. 2001), maior será a chance desta nova população permanecer no ambiente sem acarretar prejuízos às outras espécies nativas (Ashikaga et al. 2010). Ao contrário da presença de híbridos artificiais introduzidos em ambientes aquáticos, que pode ser uma grande ameaça no que se refere à conservação de espécies nativas (Porto-Foresti et al. 2008).

Análises comparativas entre os cariótipos identificaram a ausência de híbridos perfeitos nesta amostragem, sendo possível postular que os primeiros eventos de hibridização entre indivíduos com 50 e 52 cromossomos sejam antigos, e desta forma, estes indivíduos podem não estar mais presentes na população. Além disso, devido a essa quantidade de variação entre os híbridos, é possível que outros variantes com 51 cromossomos possam existir, entretanto, estes variantes podem não ter sido identificados na presente amostragem, ou até mesmo, alguns destes apresentem inviabilidade para seus conjuntos cromossômicos.

Os espécimes com $2n=52$ cromossomos analisados neste trabalho possuem a macroestrutura cromossômica (número diplóide e fórmula cariotípica) idêntica a uma população proveniente do Parque Estadual do rio Doce (bacia do Leste) estudada por Giuliano-Caetano et al. (2001), os quais pertencem ao cariomorfo C, segundo a classificação de cariomorfos proposta por Bertollo (2007) e revista por Da Rosa et al. (2012). Apresentam também algumas correspondências com o exemplar da lagoa Juturnaíba no Rio de Janeiro ($2n=52$ cromossomos, bacia do Leste) analisado por Giuliano-Caetano (1986), classificado por Da Rosa et al. (2012) como cariomorfo F, mas que provavelmente também se trate do cariomorfo C. Os exemplares portadores de 52 cromossomos, provenientes da mesma localidade das amostras do presente trabalho, analisados por Diniz e Bertollo (2003), também devem pertencer ao cariomorfo C, ao invés de constituírem um cariomorfo independente, o D, conforme proposto também por Da Rosa et al. (2012). Assim, provavelmente devido à quebra de barreira geográfica, o cariomorfo C aqui descrito, deve ser oriundo das bacias do Leste. Na bacia do rio São Francisco, também há relato de dois cariomorfos distintos em simpatria para *Hoplias malabaricus* denominados: A ($2n=42$) e F ($2n=40$); para este caso não foram encontrados formas híbridas (Bertollo et al. 2000). O cariomorfo A de *H. malabaricus* também é encontrado nas bacias do Leste (Born e Bertollo et al. 2006), reforçando

assim a hipótese do cariomorfo C com $2n=52$ de *H. unitaeniatus* da bacia do rio São Francisco ter sua origem em uma das bacias do Leste.

Os rios costeiros também compartilham grande diversidade de peixes endêmicos com suas áreas adjacentes, levando a existência faunas irmãs, podendo haver compartilhamento de populações de uma mesma espécie (Ribeiro et al. 2011), fato que possivelmente ocorre com *H. unitaeniatus*. Além disso, não há ocorrência de outros cariomorfos de *H. unitaeniatus* na bacia do Leste, reforçando a hipótese de que o cariomorfo C, com 52 cromossomos, aqui descrito, deve ser oriundo das bacias do Leste.

Os espécimes com $2n=50$ cromossomos do presente trabalho possuem estrutura cromossômica semelhante a uma das formas encontrada por Diniz e Bertollo (2006). Considerando a pequena variação existente entre os variantes propostos por tais autores para os indivíduos com 50 cromossomos, é possível sugerir que eles constituam apenas um cariótipo, semelhante ao do presente trabalho. Neste contexto, os exemplares com 50 cromossomos e fórmula cariotípica $32m + 14sm + 4a$; $NF=96$ corresponderiam ao cariomorfo D. Desta forma, os exemplares com 51 cromossomos seriam variantes geradas, inicialmente, pela hibridização entre os cariomorfos C (52 cromossomos) e D (50 cromossomos). Vale ressaltar que, considerando $2n=50$ como uma forma cromossômica bem definida, a bacia do rio São Francisco é a única localidade que apresenta dois cariomorfos de *H. unitaeniatus* vivendo em simpatria.

Sendo assim uma nova classificação dos cariomorfos de *H. unitaeniatus* é proposta neste trabalho, sendo que os cariomorfos A, B e E possuem 48 cromossomos e estão presentes nas bacias Amazônica (A e B) e na bacia do Alto Paraná (E), o cariomorfo C possui 52 cromossomos e pode ser encontrado nas bacias do Leste e do São Francisco, e o cariomorfo D passa a possuir 50 cromossomos e pode ser encontrado somente na bacia do São Francisco.

Associando-se os dados aqui apresentados aos disponíveis em literatura, o conjunto de populações de *H. unitaeniatus* deve ser tratado como um complexo de espécies, assim como proposto por Giuliano-Caetano et al. (2001). Considerando as mudanças referentes aos cariomorfos propostas neste trabalho, o complexo *H. unitaeniatus* passa a ser formado por cinco unidades biológicas distintas (Tab.2).

Uma população natural pode ser separada de outra com base no fluxo gênico entre elas (Futuyma, 1997). Modificações nesse fluxo podem ocorrer devido a quebras de barreiras naturais ou por ações antrópicas, podendo fazer com que espécies que se encontravam em alopatria passem a uma situação de simpatria, permitindo ocorrer fluxo gênico entre elas, e, eventualmente, ocasionando a formação de híbridos naturais. O processo de hibridização pode envolver cruzamentos entre espécies distintas (Bartley et al. 2001) ou dentro de um complexo de espécies.

O processo natural de hibridização representa uma importante força da evolução (Barton, 2001; Salzburger et al. 2002), e não é considerado uma ameaça à conservação de outras espécies, mas sim, uma parte de sua própria história evolutiva (Trigo, 2008). O processo de hibridização é amplamente observado entre os peixes, pois apresentam características como fertilização externa, fracos mecanismos de isolamento comportamentais, desigual abundância de parentais, entre outras (Campton, 1987; Allendorf e Waples, 1996; Scribner et al. 2001). Um processo de hibridização natural já foi observado, por exemplo, no grupo *Astyanax bimaculatus* (Peres et al. 2011), onde espécimes com o mesmo número diplóide, mas diferentes cariótipos coexistiam em simpatria. Essa condição originou híbridos entre dois citótipos diferentes, e assim, como no presente estudo, eram cromossomicamente intermediários aos parentais. Ainda de acordo com os autores, a hibridização pode criar novas variações genéticas, o que viabiliza a sobrevivência e reprodução desses híbridos. Para uma população de *Astyanax fasciatus* vivendo em sintopia na Cachoeira de Emas (Pirassununga – SP) foi detectado dois

cariótipos padrões com 46 e 48 cromossomos e formas variantes com 47 cromossomos, os quais parecem resultar cruzamentos aleatórios entre os dois cariótipos padrões e seus descendentes (Pazza et al. 2006).

Diante das características cromossômicas encontradas no presente trabalho, é plausível acreditar que o processo natural de hibridização esteja ocorrendo entre os exemplares de *H. unitaeniatus* da bacia do rio São Francisco, de maneira que os cariomorfos com 50 e 52 cromossomos representem duas unidades biológicas distintas e bem definidas, com ocorrência simpátrica nesta região. A ocorrência de distintos cariomorfos em diferentes bacias hidrográficas brasileiras e a presença da região de simpatria entre duas formas na bacia do rio São Francisco fortalece a hipótese de que *H. unitaeniatus* corresponda a um complexo de espécies, o qual carece de caracteres morfológicos mais consistentes para que se possa desmembrá-lo, já que morfológicamente as amostras de todos os cariomorfos são muito semelhantes. Apesar da grande variação cromossômica existente no complexo *H. unitaeniatus*, é plausível supor que não há mecanismos de isolamento reprodutivo entre os cariomorfos, como pode ser observado neste trabalho com todos os variantes híbridos

Tabela 2: Revisão dos cariomorfos de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.

Município	Localidade (rio)	Bacia Hidrográfica	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Cariomorfo	AgRONS	REFERÊNCIAS
Aripuanã - MT (Brasil)	rio Aripuanã	Rio Amazonas	48	96	48m/sm	A	-	1
Manaus - AM (Brasil)	rio Negro		48	96	48m/sm			2
Porto Velho - RO (Brasil)	-		48	96	48m/sm			
Corrientes (Argentina)	-	Rio Paraná/Paraguai	48	96	48m/sm			4
Miranda - MS (Brasil)	rio Miranda	Rio Paraguai	48	96	48m/sm		múltipla	7
Passo do Lontra - MS (Brasil)	lagoas marginais ao rio Miranda		48	96	48m/sm			
Manaus - AM (Brasil)	rio Negro	Rio Amazonas	48	94	46m/sm+2st/a	B	-	2
			48	94	46m/sm+2st/a			
			48	95	47m/sm+1st/a			
			3x=72	-	69m/sm+3st/a		simples	3
Paramaribo (Suriname)	-		48	94	46m/sm+2a		-	4
Casimiro de Abreu - RJ (Brasil)	lagoa de Juturnaíba	Leste	52	95	43m/sm+9a	C	-	1
Parque Estadual do Rio Doce - MG (Brasil)	lago Dom Hévelvecio		52	98	46m/sm+6a			4
João Pinheiro - MG (Brasil)	lagoa Marginal ao rio da Prata		Rio São Francisco	52	100		44m/sm+4st+4a	múltipla
		52		98	3m+16sm+6a		8	
		50		-	46m/sm+4a		D	múltipla
		50		-	46m/sm+1st+3a			
		50		-	43m/sm+3st+4a			
		50		-	43m/sm+2st+5a			
			50	96	32m+14sm+4a		8	
Guataparã - SP (Brasil)	rio Mogi-Guaçu	Alto rio Paraná	48	96	44m/sm+4st	E	múltipla	5
Bataguassú - MT (Brasil)	rio Paraná		48	96	44m/sm+4st			5
Naviraí - MS (Brasil)			48	92	44m/sm+4st/a			7
Aguai - SP (Brasil)	rio Mogi-Guaçu		48	92	44m/sm+4st/a			
João Pinheiro - MG (Brasil)	Lagoa Marginal ao rio da Prata	Rio São Francisco	51	-	44m/sm+3st+4a	-	múltipla	6
			51	-	46m/sm+5st+2a			
			51	-	46m/sm+4st+1a			
			51(h1)	97	31m+15sm+5a			
			51(h2)	98	32m+15sm+4a			
			51(h3)	96	31m+14sm+6a			8

* **1** Giuliano-Caetano, 1986; **2** Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; **3** Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990; **4** Giuliano-Caetano et al. 2001; **5** Diniz e Bertollo, 2003; **6** Diniz e Bertollo, 2006; **7** Da Rosa et al. 2012; **8** Presente trabalho; **MT** Estado do Mato Grosso; **AM** Estado da Amazônia; **RO** Estado de Rondônia; **MS** Estado do Mato Grosso do Sul; **RJ** Estado do Rio de Janeiro; **MG** Estado de Minas Gerais; **SP** Estado de São Paulo; **m** metacêntrico; **sm** submetacêntrico; **st** subteloecêntrico; **a** acrocêntrico; **NF** Número Fundamental

REFERÊNCIAS

ALLENDORF, F. W.; WAPLES, R. S. Conservation and genetics of salmonid fishes. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (Ed.). **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York: Chapman and Hall, 1996. 512p. 238–280.

ALLENDORF, F. W. et al. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n.11, p.613-622, 2001.

ASHIKAGA, F. V. et al. Invasão dos híbridos em águas continentais brasileiras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v.38, p.1-4, 2010.

BARBOSA, J. M.; SOARES, E. C. Perfil da ictiofauna da bacia do rio São Francisco: estudo preliminar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.4, n.1, p.155-172, 2009.

BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish and Fisheries**, v.10, p.325-337, 2001.

BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, v.10, p.551– 568, 2001.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, n.2, p.103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v.8, p.603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. Chromosome evolution in the neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: PISANO, E. et al. (Ed.) **Fish Cytogenetics**. USA: Science Publishers, 2007. 518p. 195-211.

BLANCO, D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v.81, p.351-357, 2012.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p.205-210, 2006.

CAMPTON, D. E. Natural hybridization and introgression in fishes: Methods of detection and genetic interpretations. In: RYMAN, N.; UTTER, F. (Ed.) **Population Genetics and Fishery Management**. Seattle: University of Washington Press, 1987. 420p. 161–192.

DA ROSA, R. et al. Evolutionary trends in *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.467-475, 2012.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, v.56, n.3, p.303-311, 2003.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.453-458, 2006.

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

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997. 646 p.

GIULIANO-CAETANO, L. Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (PISCES, ERYTHRINIDAE) de diferentes bacias hidrograficas brasileiras. 1986. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, state of Amazonas). **Brazilian Journal of Genetic**, v.11, n.2, p.299-306, 1988.

GIULIANO-CAETANO, L. et al. Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v.66, p.59-64, 2001.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an an-aesthetic and method of sampling intertidal rock-pool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p.239-244, 2004.

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

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

LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v.87, p.433-438, 2012.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v.44, p.903-910, 2001.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R. E.; SVEN, O. K.; FERRARIS Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p. 238-240.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, AG-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. **Cytogenetic and Genome Research**, v.112, p.313-319, 2006.

PERES, W. A. M. et al. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group”(Characiformes: Characidae) **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.519-526, 2012.

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

PORTO-FORESTI, F. et al. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid of the species Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.195-202, 2008.

RIBEIRO, A. L.; LIMA, F. C. T.; MENEZES, N. A. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Ed.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Roca, 2011. 306p. 261-276.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. (2004) Migratory Fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J. et al. (Ed.) **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canadá: IDRC publications, 2004. 380p. 195-232.

SCRIBNER, K. T.; PAGE, K. S.; BARTRON, M. L. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.10, p.293-323, 2001.

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

TRIGO, T. C. et al. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular Ecology**, v.17, p.4317-4333, 2008.

CAPÍTULO II

**Citogética comparativa entre populações do complexo *Hoplerythrinus unitaeniatus*
(Characiformes, Erythrinidae) proveniente de diferentes bacias hidrográficas
brasileiras**

RESUMO

No presente trabalho foram analisadas citogeneticamente, através de coloração convencional por Giemsa, bandamento C, impregnação por nitrato de prata e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S, populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus* proveniente de cinco bacias hidrográficas brasileira: Arinos (pertencente a bacia Amazônica), Araguaia, Paraguai, Alto Paraná e São Francisco. O número diplóide encontrado foi $2n=48$ para as populações do Paraguai e Alto Paraná, $2n=50$ para a população do São Francisco e $2n=52$ para as populações do rio Arinos, Araguaia e São Francisco. Os espécimes com 50 e 52 cromossomos para a bacia do São Francisco ocorreram em simpatria. O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina localizados principalmente em posição intersticial e pericentromérica na maioria dos cromossomos. A impregnação por nitrato de prata demonstrou AgRONS simples para as populações do Arinos e Araguaia e AgRONS múltiplas para o Paraguai, Alto Paraná e São Francisco. A FISH com sondas de DNAr evidenciou vários cromossomos portadores desse cistrons, além da ocorrência de sintênia em todas as populações. Os dados obtidos vem reforçar a idéia de que *Hoplerythrinus unitaeniatus* se trate realmente de um complexo de espécies.

Palavras-chaves: cariomorfos, complexo de espécie, marcadores citogenéticos, variabilidade cromossômica

INTRODUÇÃO

Os Characiformes formam um grupo bastante diverso, distribuído em 23 famílias, com cerca de 270 gêneros e aproximadamente 1680 espécies. Desse total de espécies, 209 ocorrem na África e as restantes apresentam-se distribuídas pela região Neotropical, onde atingem sua maior diversidade, representando 30% da ictiofauna neotropical (Nelson, 2006).

Dentre as famílias de Characiformes encontra-se Erythrinidae, que é representada por apenas três gêneros: *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903, todos endêmicos da América do Sul, com ampla distribuição pelas bacias brasileiras (Oyakawa, 2003). Popularmente conhecidos como traíras e trairões (*Hoplias*) e jejus (*Hoplerythrinus* e *Erythrinus*), são encontrados em diferentes habitats, como, lagos, lagoas, e grandes rios, e em relação a seus hábitos alimentares, são principalmente carnívoros.

Hoplerythrinus possui apenas três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) e *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829), sendo apenas esta última encontrada em território brasileiro, além de ocorrer também na América Central e em outros países da América do Sul. *H. cinereus* e *H. gronovii* possuem distribuição restrita e ocorrem apenas em Trinidad e Tobago e Guiana Francesa, respectivamente (Oyakawa, 2003). Morfologicamente, *Hoplerythrinus* difere-se dos demais membros da família Erythrinidae pela presença de uma mancha preta arredondada na região do opérculo e uma faixa preta ao longo do meio do corpo (Oyakawa, 2003). Uma característica marcante tanto de *Hoplerythrinus* quanto de *Erythrinus* é a presença de rica vascularização na bexiga natatória, o que faz com que tenham respiração aérea facultativa (Fernandes e Moron, 1996). Quando o ambiente encontra-se em hipóxia ou anóxia severa, o oxigênio passa a ser absorvido via bexiga natatória, permitindo sua sobrevivência durante períodos de estiagem (Mariano et al. 2009).

Em relação aos estudos citogenéticos, somente *H. unitaeniatus* possui caracterização cromossômica e aparenta ser uma espécie bastante diversificada, classificados com base no número diplóide e morfologia cromossômica. Os cariomorfos A, B e E apresentam $2n=48$ cromossomos e são encontrados na bacia Amazônica (A e B), na bacia do rio Paraguai (A) e na bacia do rio Paraná (E). O cariomorfo C apresenta $2n=52$ cromossomos e é encontrado nas bacias do Leste e do rio São Francisco. Por fim, o cariomorfo D apresenta $2n=50$ cromossomos e é endêmico da bacia do rio São Francisco, além disso espécimes híbridos com $2n=51$ cromossomos também são encontrados nesta bacia (Capítulo 1). *Hoplerythrinus* é o único gênero de Erythrinidae em que não foi detectada a presença de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1986 e 1988; Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012).

Atualmente, muitas espécies de peixes apresentam grande variabilidade em nível cromossômico, contudo são morfologicamente semelhantes, desse modo, vários grupos estão sendo caracterizados como complexo de espécies. Para *H. unitaeniatus*, Giuliano-Caetano et al. (2001) propuseram que o grupo não se tratava de uma única espécie para território brasileiro, mas sim de um complexo de espécies, devido tanto a variação estrutural quanto numérica encontrada em diferentes populações.

No presente trabalho, foi realizada uma análise cromossômica comparativa entre populações de *H. unitaeniatus* provenientes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras: Amazonas, Araguaia, Paraguai e Alto Paraná, além de utilizar os dados presentes na literatura, com o objetivo de compreender melhor os aspectos evolutivos e biogeográficos que estariam relacionados à diversificação do grupo *H. unitaeniatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas cinco populações de *H. unitaeniatus* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tab. 1).

Tabela 1: Exemplares de *Hoplerythrinus unitaeniatus* coletados e suas respectivas localidades.

Localidade	Município	Bacia Hidrográfica	Sexo		Depósito
			♂	♀	
Rio Claro	São José do Rio Claro (MT)	Rio Arinos (Rio Amazonas)	2	4	MUZUSP 109785
Lagoa marginal ao córrego do Medo	São Miguel do Araguaia (GO)	Rio Araguaia	5	7	MUZUSP 109786
Rio Paraguai	Porto Murtinho (MS)	Rio Paraguai	7	8	Não Depositado
Rio Mogi-Guaçu	Guatapará (SP)	Alto Rio Paraná	4	4	Não Depositado
Lagoa marginal ao rio da Prata	João Pinheiro (MG)	Rio São Francisco	13	12	Não Depositado

***MT** Estado do Mato Grosso; **GO** Estado de Goiás; **MS** Estado do Mato Grosso do Sul; **SP** Estado de São Paulo; **MG** Estado de Minas Gerais

Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (Griffiths, 2000) e posteriormente sacrificados. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, órgão que possui função hematopoiética em peixes, por meio das técnicas descritas por Bertollo et al. (1978), Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). Os cromossomos foram corados com solução de Giemsa 5% e a morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços proposta por Levan et al. (1964). O número fundamental (NF) foi determinado considerando cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st) como portadores de dois braços e os acrocêntricos (a)

como portadores de apenas um braço cromossômico. O padrão de distribuição da heterocromatina foi determinado através do método proposto por Sumner (1972), com modificações na etapa de coloração (Lui et al. 2012). A detecção das regiões organizadoras de nucléolo (AgRONS) seguiu o protocolo descrito por Howell e Black (1980). Toda a análise convencional dos cromossomos foi realizada de forma sequencial (coloração convencional com Giemsa, bandamento C e AgRONS) para uma identificação mais precisa dos pares cromossômicos.

O mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos foi obtido pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com sondas obtidas de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 2001), respectivamente. As sondas de DNAr 5S e 18S foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e biotina-14-dATP, respectivamente, por *nick translation*, de acordo com as especificações do fabricante (Roche Applied Science). Todos os processos de hibridização foram realizados sob alta condição de estringência - 77% (200ng de cada sonda, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano, 2xSSC, pH 7,0 - 7,2, a 37 °C, “overnight”). Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51. O software DP2-BSW (Olympus) foi utilizado para a captura das imagens.

RESULTADOS

Os exemplares de *H. unitaeniatus* provenientes das bacias do rio Arinos (bacia Amazônica) e do rio Araguaia apresentaram $2n=52$ cromossomos com fórmulas cariotípicas semelhantes: $28m + 20sm + 4a$ e $NF=100$; e $26m + 22sm + 2st + 2a$ e $NF=102$, respectivamente (Fig. 1a, c). Para as populações da bacia do rio Paraguai e do Paraná o número diplóide encontrado foi $2n= 48$ cromossomos: $32m + 16sm$ e $NF=96$; $30m + 14 sm + 4 st$ e $NF=96$, respectivamente (Fig. 1e, g). Para a população do São Francisco os números diplóide encontrados foram $2n=50$ cromossomos: $32m + 14sm + 4a$ e $NF=96$

(Fig. 1i) e $2n=52$ cromossomos: $30m + 16sm + 6a$ e $NF=98$ (Fig. 1k). Nenhum heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo foi detectado nessas populações de *H. unitaeniatus*.

O bandamento-C demonstrou padrão semelhante nas cinco populações analisadas, sendo que a maioria dos cromossomos apresentou blocos bem evidentes de heterocromatina localizados em região intersticial e pericentromérica, contudo alguns cromossomos também apresentaram blocos heterocromáticos em posição centromérica e terminal (Fig. 1b, d, f, h, j, l).

A impregnação pelo nitrato de prata demonstrou AgRONS simples, localizadas em posição intersticial do braço longo do par metacêntrico 7 para as populações do rio Arinos e Araguaia (em destaque, Fig. 1a, c). Para as populações da bacia do rio Paraguai, Alto Paraná e São Francisco os exemplares apresentaram AgRONS múltiplas, sendo localizadas em posição intersticial do braço longo dos pares metacênicos 7 e 8 nas populações do Paraguai e Alto Paraná (em destaque, Fig. 1e, g), e para a população do São Francisco foram localizadas em posição intersticial do braço longo do par metacêntrico 7 e em posição terminal no braço curto de um cromossomo dos pares acrocêntricos 24 e 25 ($2n=50$) (em destaque, Fig. 1i), e em posição terminal no braço curto de um cromossomo dos pares acrocêntricos 24 e 25 ($2n=52$) (em destaque, Fig. 1k)

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas ribossomais 5S e 18S demonstrou diferentes pares cromossômicos portadores desses cístrons nas populações analisadas (Fig.2), conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Resultados da FISH com sondas de DNAr 18S e 5S para as populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus*.

População (Bacia)	Pares cromossômicos portadores de DNAr 18S	Pares cromossômicos portadores de DNAr 5S	Pares sintênicos
Arinos (2n=52)	2, 4, 7 e 25 e um cromossomo do par 13	2, 3, 6, 15, 25 e um cromossomo do par 26	2, 25
Araguaia (2n=52)	2, 4, 7, 8, 14, 18, 20, 22, 25 e um cromossomo dos pares 3, 15, 26	2, 6, 14, 25 e um cromossomo dos pares 3, 10, 19	2, 14, 25 e um cromossomo do par 3
Paraguai (2n=48)	2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18 e 21	2, 6, 8, 17, 21 e 22	2, 6, 21
Alto Paraná (2n=48)	1, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 17, 18, 20 e um cromossomo do par 2	1, 6, 16, 20 e um cromossomo dos pares 2 e 18	1, 6, 20 e um cromossomo dos pares 2, 18
São Francisco (2n=50)	4, 6, 7, 8, 24, 25 e um cromossomos do par 3	2, 6, 10 e um cromossomo dos pares 1e 17	6
São Francisco (2n=52)	3, 5, 24, 25 e um cromossomo do par 26	2, 5, 9 e um cromossomo dos pares 1, 4 e 16	5

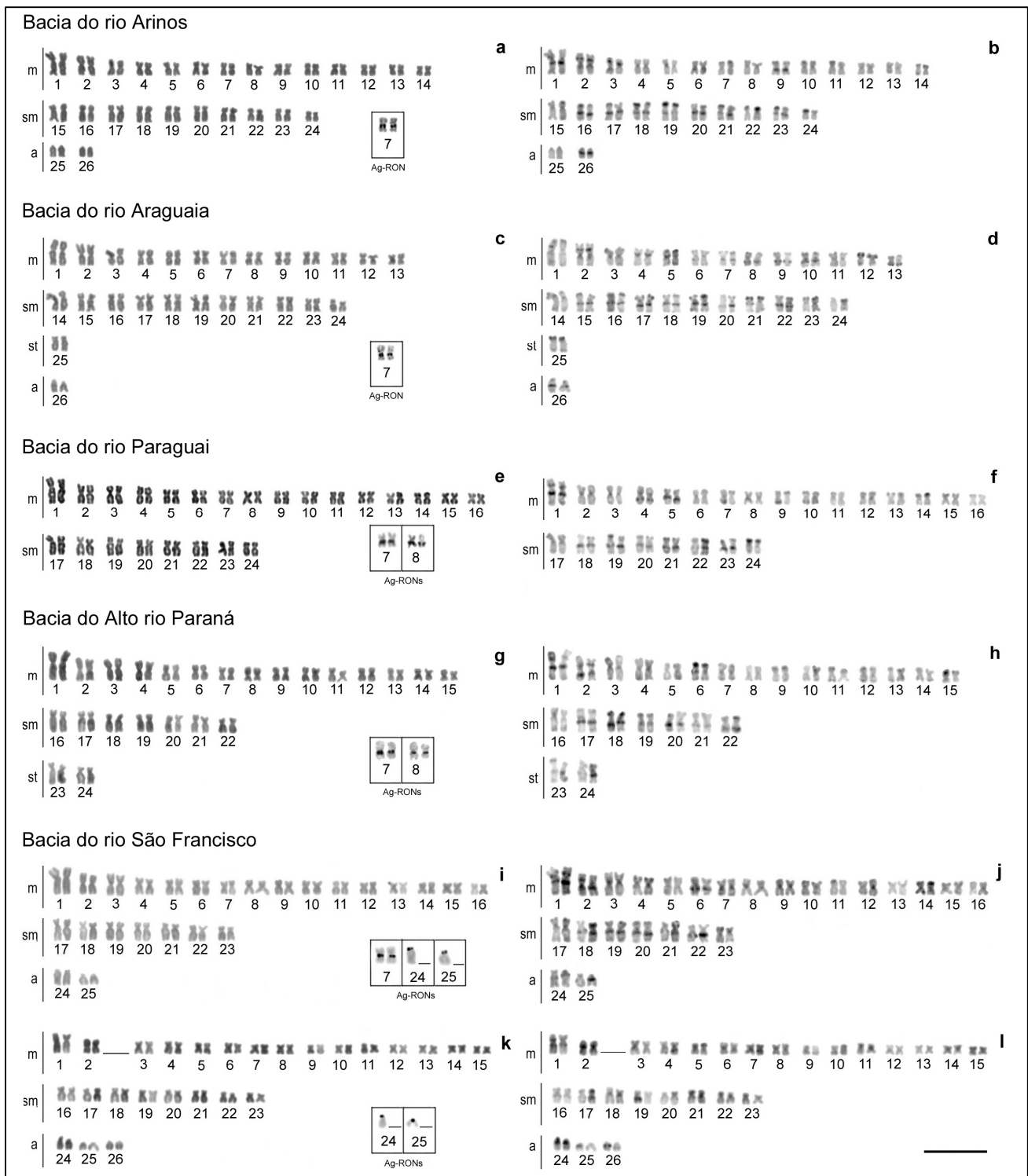


Figura 1: Cariótipos das *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes das bacias do rio Arinos (a,b), rio Araguaia (c,d), rio Paraguai (e, f), Alto rio Paraná (g, h), rio São Francisco (i, j – $2n=50$; k, l – $2n=52$). Cariótipos corados com Giemsa (a, c, e, g, j, k) e posteriormente C bandados (b, d, f, h, j, l). Em Box são apresentados os pares cromossômicos portadores de Ag-RONs para cada população. Barra = $10\mu\text{m}$.

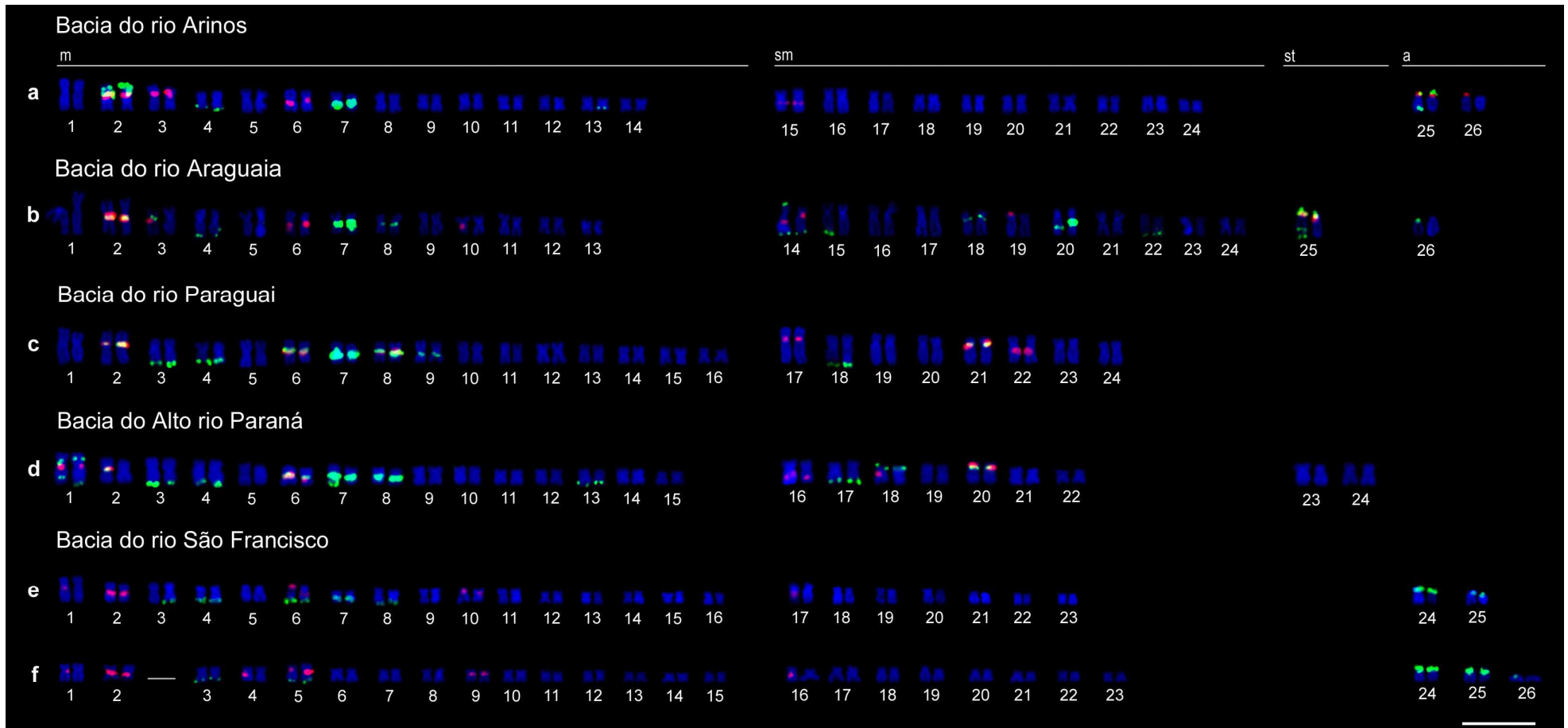


Figura 2: Cariótipos das *Hoplerthrinus unitaeniatus* hibridados com sondas DNAr 18S (FITC – sinal verde) e DNAr 5S (Rodamina – sinal vermelho) provenientes das bacias do rio Arinos (a), rio Araguaia (b), rio Paraguai (c), Alto rio Paraná (d) e rio São Francisco (e – $2n=50$; f – $2n=52$). Barra= $10\mu\text{m}$.

DISCUSSÃO

Os números diplóides encontrados em *H. unitaeniatus* são $2n=48$, $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos (Capítulo 1). No presente trabalho, os exemplares provenientes da bacia do Paraguai e Alto Paraná apresentaram $2n=48$ cromossomos, assim como já relatado para outras populações provenientes destas bacias hidrográficas (Giuliano-Caetano et al. 2001, Diniz e Bertollo, 2003; Da Rosa et al. 2012). As fórmulas cariotípicas também foram iguais as já relatadas para tais bacias.

Para as populações da bacia do Arinos e do Araguaia foi constatada a presença de 52 cromossomos, assim como relatado por Diniz e Bertollo (2003) e Giuliano-Caetano et al. (2001), que também encontraram este número diplóide para populações das bacias dos rios São Francisco e Doce, respectivamente. Diferentemente da população amazônica analisada neste trabalho, Giuliano-Caetano e Bertollo (1988) encontraram para uma população proveniente do rio Negro $2n=48$ cromossomos, alocados em quatro citótipos distintos devido à variabilidade cariotípica detectada.

Para a bacia do São Francisco foi detectada variação no número diplóide, com indivíduos em simpatria apresentando $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos, assim como relatado no Capítulo 1, além da ocorrência de híbridos naturais com 51 cromossomos e distintas fórmulas cariotípicas (Capítulo 1). Neste trabalho foi proposto que a forma com $2n=52$ cromossomos seria oriunda da bacia do leste. Os dados aqui apresentados, principalmente relacionados às populações com $2n=52$ cromossomos (Arinos e Araguaia), podem reforçar tal hipótese, pois tais populações apresentam apenas quatro cromossomos do tipo subtelo/acrocêntrico, e para a população do São Francisco e da bacia do Leste há ocorrência de seis cromossomos acrocêntricos bem característicos. Além disso, os dados de 18S mostram que há um cromossomo (par metacêntrico 7) com marcação intersticial no braço longo, que é compartilhado entre todos os cariomorfos presentes a oeste do São Francisco, inclusive a forma com $2n=50$ cromossomos do São Francisco, o qual não é encontrado nos espécimes com $2n=52$ cromossomos do São Francisco.

Seria interessante verificar se a população da bacia do rio Doce também não apresenta este cromossomo, o que poderia reforçar junto a quantidade de cromossomos acrocêntricos a hipótese de que a forma com $2n=52$ cromossomos do São Francisco teria vindo da bacia do Leste. Vale ressaltar a região da margem leste do continente sul-americano apresenta intensa atividade tectônica, favorecendo a mistura da fauna dessa região com bacias adjacentes (Ribeiro et al. 2011).

De acordo com a revisão de cariomorfos realizada no Capítulo 1, as populações do Paraguai e Alto Paraná aqui analisadas se encaixam dentro dos cariomorfos A e E, respectivamente. A população do rio São Francisco pertence ao cariomorfo C ($2n=52$) e D ($2n=50$). As populações do rio Arinos e Araguaia também se encaixam dentro do cariomorfo C, com pequenas alterações na fórmula cariotípica (Tab. 3), assim como acontece para o cariomorfo A de *Hoplias malabaricus* que também apresenta pequenas alterações na fórmula cariotípica (Blanco et al. 2010). A distribuição dos cariomorfos de *H. unitaeniatus* até agora estudados pode ser visto no mapa da Figura 3.

Todos esses estudos já realizados vêm demonstrando a variabilidade cromossômica existente nesta espécie (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Giuliano-Caetano et al. 2001, Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012; Capítulo 1) e os dados obtidos neste trabalho vêm reforçar a hipótese de que *H. unitaeniatus* não se trata de uma única espécie, mas sim do complexo de espécies *H. unitaeniatus*, como proposto por Giuliano-Caetano et al. (2001). Outras espécies de Erythrinidae, como *Erythrinus erythrinus* e *Hoplias malabaricus*, também vêm sendo consideradas como complexo de espécie, devido a variabilidade encontrada no número diplóide e principalmente na ausência e presença de sistemas de cromossomos sexuais em ambas espécies (Bertollo et al. 2000; 2004).

A presença de blocos heterocromáticos conspícuos, principalmente na região pericentromérica/intersticial, é um fato comum para *H. unitaeniatus*, sendo relatada em outros trabalhos (Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012). Os exemplares das distintas populações de *H.*

unitaeniatus analisadas no presente trabalho têm padrão semelhante de heterocromatina, com a maioria dos blocos alocados em posição intersticial (próximo ao centrômero). Alguns outros blocos são evidenciados em posição terminal ou centromérica, sendo estes equilocais na maioria dos cromossomos. Somente pela técnica de bandamento C não é possível identificar a composição da heterocromatina presente nessas regiões, porém essas bandas co-localizadas podem apresentar a mesma composição e terem se originado em função da disposição dos cromossomos no núcleo durante a replicação (Schweizer e Loidl, 1987). Esse modelo prevê que a heterocromatina pode ser transferida tanto entre cromossomos homólogos quanto entre não homólogos, tornando-se co-localizada em diversos cromossomos (Iñigo et al. 1996).

Em relação à impregnação pelo nitrato de prata, AgRONS simples só haviam sido relatadas para o espécime triploide da bacia amazônica (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990), como encontradas nos exemplares da bacia do rio Arinos e Araguaia. Já sítios múltiplos portadores das AgRONS, assim como encontrado para a população do Paraguai e Alto Paraná, representam a situação mais freqüente no grupo (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012; Capítulo 1). Variação na localização destes sítios também pode ser encontrada em *H. unitaeniatus*. Em alguns trabalhos, este sítio foi localizado na região próxima ao centrômero (Da Rosa et al. 2012) e intersticial (Diniz e Bertollo, 2003), assim como nas populações deste estudo, entretanto, em outras as AgRONS podem ser observadas na região terminal (Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990; Da Rosa et al. 2012, Capítulo 1). Essa variação observada na posição do sítio portador no cromossomo pode ser devido a rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica e/ou translocação.

Em relação à hibridização com sondas de DNAr 18S e 5S, as informações para o grupo ainda são escassas. A análise aqui realizada mostrou um número elevado de cromossomos portadores desses sítios, com até 21 cromossomos portando DNAr 18S e até 12 cromossomos portadores de cístrons de

DNAr 5S. Para a família Erythrinidae é comum um número elevado de sítios de DNAr. Em *H. malabaricus* pode-se observar um número elevado de cromossomos portadores de DNAr 18S (Cioffi et al. 2009a; Cioffi e Bertollo, 2010; Vitorino et al. 2011) e para *E. erythrinus* pode-se observar, tanto para DNAr 18S quanto 5S, um número também elevado de cromossomos portadores desses cístrons (Cioffi et al. 2010; Martins et al. 2013). Diferentemente, para *H. aimara* e *H. intermedius* é verificado uma condição menos variável, com poucos cromossomos portadores desses cístrons (Blanco et al. 2011).

Sítios sintênicos de DNAr 18S e 5S do tipo adjacentes e não-adjacentes pode ser observados nas populações do Alto Paraná, Araguaia, Arinos e São Francisco, e sítios sintênicos adjacentes na população do rio Paraguai. É provável que esta co-localização dos genes de rRNA seja uma característica ancestral para *H. unitaeniatus*, visto que é uma característica compartilhada tanto com *H. malabaricus* (Cioffi et al. 2009b) quanto com *E. erythrinus* (Cioffi et al. 2010; Martins et al. 2012).

Os estudos até agora realizados com *H. unitaeniatus* sugerem que tanto os espécimes com $2n=48$ quanto os com $2n=52$ cromossomos podem ser considerados como condições basais para o grupo (Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo, 2003; Da Rosa et al. 2012). Para Erythrinidae é verificada a ocorrência de $2n=50$ cromossomos em *H. lacerdae* (Morelli et al. 2007), *H. aimara* e *H. intermedius* (Blanco et al. 2011) e em *Erythrinus erythrinus* encontra-se uma variação de $2n=51/52$ a $2n=53/54$ cromossomos, o fato dessas espécies apresentarem número diplóide superior a 50 corrobora com a hipótese de que os espécimes de *H. unitaeniatus* com $2n=52$ possam ser considerados ancestrais para o grupo (Giuliano-Caetano et al. 2001; Diniz e Bertollo, 2003; Da Rosa et al. 2012). Contudo, estes mesmos autores também não descartam os espécimes com $2n=48$ como condição ancestral para o grupo.

O território sul americano pode ser subdividido em terras baixas (abaixo de 250m em relação ao nível do mar) e terras altas (altitudes que ultrapassam 500m, exceto os Andes), e essas terras altas

caracteriza a área denominada Escudo Brasileiro e Escudo das Guianas. Embora seja uma divisão considerada ainda arbitrária é de grande importância para a ecologia e biogeografia da ictiofauna da América do Sul. (Ribeiro et al. 2011). Espécimes de *H. unitaeniatum* com $2n=48$ cromossomos estão presentes tanto no Escudo Brasileiro quanto no Escudo das Guianas. Este fato condiz com a hipótese de $2n=48$ cromossomos ser o basal para *H. unitaeniatum*, pois essas regiões de Escudos possuem muitas espécies de peixes endêmicos e que vem representar grupos muito antigos, com distribuições relictuais e a presença de espécimes com um mesmo número diplóide localizados em bacias distintas mostra que muitas são capazes de ultrapassar os limites entre os divisores de água de bacias adjacentes (Ribeiro et al. 2011) e serem encontrados em diversos locais.

Também não se pode deixar de considerar que os espécimes com $2n=50$ cromossomos encontrados na bacia do rio São Francisco possam ser ancestrais para o grupo, pois apresentam o mesmo número diplóide de *H. lacerdae*, *H. aimara* e *H. intermedius* (Morelli et al. 2007; Blanco et al. 2011) e também estão alocados dentro do Escudo Brasileiro, sendo assim, pode ter ocorrido duas linhagens evolutivas distintas para esses espécimes, dando origem tanto a espécimes com $2n=48$ e $2n=52$ cromossomos.

Com os dados até agora disponíveis para o gênero *Hoplerythrinus* não é possível determinar realmente a condição ancestral para o grupo, mas com os estudos realizados até o momento com *H. unitaeniatum* o mais plausível é considerar $2n=48$ cromossomos como condição ancestral, pois a ocorrência deste número diplóide em diferentes escudos corrobora fortemente para esta hipótese. Estudos com as outras espécies de *Hoplerythrinus*: *H. gronovii* e *H. cinereus*, que ocorrem em Trinidad e Tobago e Guiana Francesa, respectivamente (Oyakawa, 2003), seria de grande importância para se determinar realmente a condição basal para este gênero

Tabela 3: Revisão dos cariomorfos de *Hoplerthrinus unitaeniatus*.

Localidade	Bacia Hidrográfica	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Cariomorfo	AgRONS	REFERÊNCIAS		
Rio Aripuanã, Aripuanã, MT, Brasil	Rio Amazonas	48	96	48m/sm	A	-	1		
Rio Negro, Manaus, AM, Brasil		48	96	48m/sm			2		
Porto Velho, RO, Brasil		48	96	48m/sm			4		
Corrientes, Argentina	Rio Paraná/Paraguai	48	96	48m/sm		múltipla	-	7	
Rio Miranda, Miranda, MS, Brasil	Rio Paraguai	48	96	48m/sm				9	
Lagoas marginais ao rio Miranda, Passo do Lontra, MS, Brasil		48	96	32m + 16sm				2	
Rio Paraguai, Porto Murtinho, MS, Brasil	Rio Amazonas	48	94	46m/sm+2st/a		B	-	3	
Rio Negro, Manaus, AM, Brasil		48	94	46m/sm+2st/a				4	
		48	95	47m/sm+1st/a				3	
		3x=72	-	69m/sm+3st/a	-			4	
Paramaribo (Suriname)		48	94	46m/sm+2a	C			-	1
Lagoa Juturnaíba, Casimiro de Abreu, RJ, Brasil	Leste	52	95	43m/sm+9a		4			
Lago Dom Hévelcio, Parque Estadual do Rio Doce – MG (Brasil)		52	98	46m/sm+6a		5			
Lagoa Marginal ao rio da Prata, João Pinheiro, MG, Brasil	Rio São Francisco	52	100	44m/sm+4st+4a		múltipla	-		8
Rio Claro, São José do Rio Claro, MT, Brasil		52	98	3m+16sm+6a					9
Lagoa marginal ao córrego do Medo, São Miguel do Araguaia, GO, Brasil	Rio Araguaia	52	102	26m + 22sm + 2st + 2a	D	múltipla	6		
Lagoa Marginal ao rio da Prata, João Pinheiro, MG, Brasil	Rio São Francisco	50	-	46m/sm+4a			8		
		50	-	46m/sm+1st+3a			5; 9		
		50	-	43m/sm+3st+4a			5		
		50	-	43m/sm+2st+5a			7		
Rio Mogi-Guaçu, Guataporã, SP, Brasil	Alto rio Paraná	48	96	44m/sm+4st	E	múltipla	6		
Rio Paraná, Bataguassú, MT, Brasil		48	96	44m/sm+4st			8		
Rio Paraná, Naviraí, MS, Brasil		48	92	44m/sm+4st/a			6		
Rio Mogi-Guaçu, Aguaí, SP, Brasil		48	92	44m/sm+4st/a			8		
Lagoa Marginal ao rio da Prata, João Pinheiro, MG, Brasil	Rio São Francisco	51	-	44m/sm+3st+4a	-	múltipla	6		
		51	-	46m/sm+5st+2a			8		
		51	-	46m/sm+4st+1a			6		
		51A	97	31m+15sm+5a			8		
		51B	98	32m+15sm+4a			6		
		51C	96	31m+14sm+6a			8		

* **1** Giuliano-Caetano, 1986; **2** Giuliano-Caetano e Bertollo, 1988; **3** Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990; **4** Giuliano-Caetano et al. 2001; **5** Diniz e Bertollo, 2003; **6** Diniz e Bertollo, 2006; **7** Da Rosa et al. 2012; **8** Capítulo 1; **9** Presente trabalho; **MT** Estado do Mato Grosso; **AM** Estado da Amazônia; **RO** Estado de Rondônia; **MS** Estado de Mato Grosso do Sul; **RJ** Estado do Rio de Janeiro; **MG** Estado de Minas Gerais; **SP** Estado de São Paulo; **GO** Estado de Goiás; **m** metacêntrico; **sm** submetacêntrico; **st** subteloecêntrico; **a** acrocêntrico; **NF** Número Fundamental

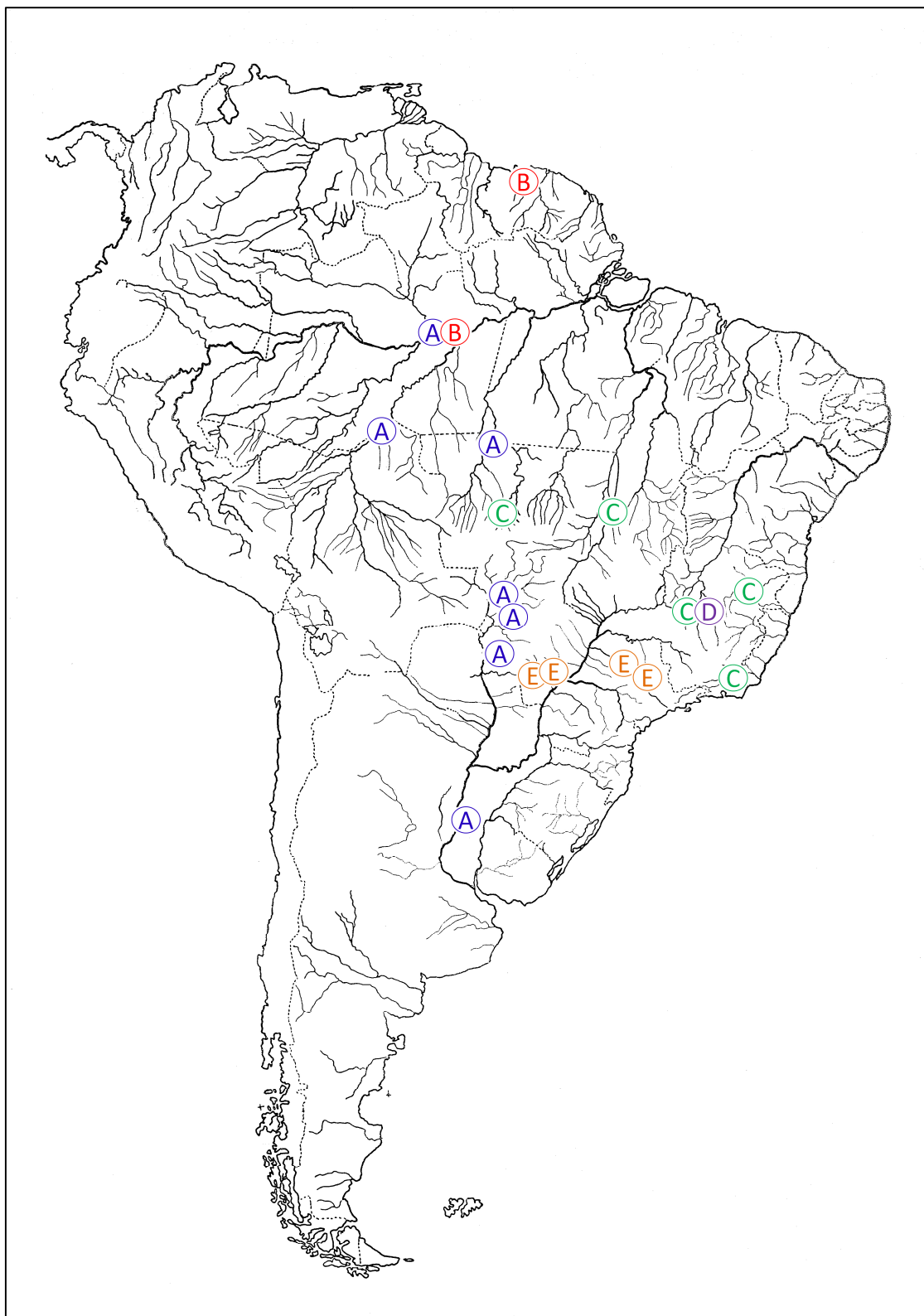


Figura 3: Distribuição dos cariomorfos de *Hoplerthrinus unitaeniatus* estudados até o momento. Cariomorfos A, B e E: $2n=48$, cariomorfo C: $2n=52$ e cariomorfo D: $2n=50$.

REFERÊNCIAS

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, n.2, p.103-120, 1978.

BERTOLLO, L. A. C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v.8, p.603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. et al. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). **Heredity**, v.93, p.228-233, 2004.

BLANCO, D. R. et al. Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n.2, p.361-368, 2010.

BLANCO, D. R. et al. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, p.71-78, 2011.

BLANCO, D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v.81, p.351-357, 2012.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, v.10, n.34, p.1-11, 2009a.

CIOFFI, M. B. et al. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research**, v.125, p.132-141, 2009b.

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

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evolutionary Biology**, v.10, n.271, p.1-11, 2010.

DA ROSA, R. et al. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.467-475, 2012.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, v.56, n.3, p.303-311, 2003.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.453-458, 2006.

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E. Respiratory organs in erythrinid fishes. In: VAL, A. L.; RANDALL, D. I.; MACKINLEY, D. (Ed.). **Proceeding Of Physiology of Tropical Fishes**. San Francisco, American Fisheries Society, 1996. 141p. 93-100.

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

GIULIANO-CAETANO, L. Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (PISCES, ERYTHRINIDAE) de diferentes bacias hidrograficas brasileiras. 1986. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). I. Chromosome polymorphism in the rio Negro population (Manaus, state of Amazonas). **Brazilian Journal of Genetic**, v.11, n.2, p.299-306, 1988.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic variability in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). II. Occurrence of natural triploidy. **Brazilian Journal of Genetic**, v.13, n.2, p.231-237, 1990.

GIULIANO-CAETANO, L. et al. Comparative cytogenetic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v.66, p.59-64, 2001.

GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an an-aesthetic and method of sampling intertidal rock-pool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p.239-244, 2004.

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

IÑIGO, R. E.; FERNANDÉZ-CALVÍN, B.; GARCÍA DE LA VEGA, C. Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: in situ localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). **Heredity**, v.70, p.70-76, 1996.

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

LUI, R. L. et al. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. **Biotechnic & Histochemistry**, v.87, p.433-438, 2012.

MARIANO, W. S. et al. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) exposto ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.210-223, 2009.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v.44, p.903-910, 2001.

MARTINS, N. F. et al. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.23, p.261-269, 2012.

MORELLI, S.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.897-903, 2007.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4.ed. New York: Wiley-Interscience, 2006. 601p.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R. E.; SVEN, O. K.; FERRARIS Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p. 238-240.

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

RIBEIRO, A. L.; LIMA, F. C. T.; MENEZES, N. A. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Ed.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Roca, 2011. 306p. 261-276.

SCHUWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. In: STAHL, A.; LUCIANI, J. M.; VAGNER-CAPODANO, A. M. (Ed.) **Chromosomes Today**. London: Allen & Unwin, 1987. 317p. 61-74.

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

VITORINO, C. A. et al. Molecular cytogenetics and its contribution to the understanding of the chromosomal diversification in *Hoplias malabaricus* (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v.78, p.1239-1248, 2011.

CAPÍTULO III

**Mapeamento físico de diferentes classes de DNA repetitivo no genoma de
Hoplerythrinus unitaeniatus (Characiformes: Erythrinidae) de diferentes bacias
hidrográficas brasileiras**

RESUMO

No presente trabalho, foram realizadas hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) com diferentes sondas de DNA repetitivos. As hibridizações foram feitas em populações de *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes de cinco bacias hidrográficas distintas: Amazônia, Araguaia, Paraguai, Alto Paraná e São Francisco. Foram utilizados como sondas sequência telomérica (TTAGGG)_n, oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites: (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀, repetições de microsátélite (GATA)_n e histonas H3 e H4. A FISH com sequência telomérica (TTAGGG)_n detectou sítios restritos a porção terminal dos cromossomos em todas as populações. Os microsátélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ mostraram-se alocados preferencialmente em posição terminal dos cromossomos de todas as populações, com algumas regiões intersticiais marcadas. Já para as repetições de microsátélite (GATA)_n foi verificado um padrão disperso pelos cromossomos. As sondas de histonas H3 e H4 também mostraram-se dispersas, mas com alguns acúmulos em posição terminal e intersticial de alguns cromossomos. Este é o primeiro estudo utilizando diferentes marcadores de DNA repetitivo no genoma de *H. unitaeniatus*, os quais apresentaram um padrão de distribuição uniforme entre as diferentes populações, mostrando que essa espécie, apesar de ser cromossômicamente diversa, mantém um padrão de genoma conservado.

Palavras chaves: histonas H3 e H4, marcadores moleculares, microsátélites, seqência telomérica.

INTRODUÇÃO

O genoma de organismos eucariotos é constituído, em grande parte, por DNA repetitivo. Essas sequências de DNA, que estão presentes em cópias múltiplas, podem representar uma grande parte do genoma (Charlesworth et al. 1994). Desse modo, a variação existente entre os genomas de diferentes organismos, é na maioria das vezes, devido à diferença na quantidade de DNA repetitivo presente nesse genoma (Martins et al. 2007).

Os DNA repetitivos incluem sequências organizadas *em tandem* (Charlesworth et al. 1994), que são subdivididas de acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, e são classificadas em DNA microsátelite, minisátelite e satélite (Eppelen e Eppelen-Haupt, 2002) e famílias multigênicas, como os genes de histonas e os DNA ribossomais (Martins et al. 2011), e sequências dispersas, como os transposons e retrotransposons (Charlesworth et al. 1994).

Os segmentos do genoma que contém DNA repetitivo são altamente variáveis, e devido a esse alto grau de polimorfismo, são considerados bons marcadores moleculares (Jeffreys et al. 1985). Além disso, DNA repetitivo apresenta uma evolução muito rápida, o que explicaria o alto grau de divergência dessas sequências entre espécies intimamente relacionadas (Singer, 1982).

Hoplerythrinus Gill, 1896 é um pequeno gênero de Erythrinidae e possui apenas três espécies: *H. cinereus* (Gill, 1858), *H. gronovii* (Valenciennes, 1847) e *H. unitaeniatus* (Agassiz, 1829). Somente *H. unitaeniatus* está presente em território brasileiro, sendo amplamente distribuída entre as bacias hidrográficas brasileiras (Oyakawa, 2003). Esta espécie tem se mostrado bastante diversa cromossomicamente, distribuída em diferentes cariomorfos baseados no número diplóide e estrutura cariotípica (Capítulo I e II).

Com o objetivo de progredir no conhecimento relacionado à organização genômica de *H. unitaeniatus*, foram realizadas hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) com diferentes classes de DNAs repetitivos: sequência telomérica, microsátélites e histonas H3 e H4.

MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisadas populações de *H. unitaeniatus*, provenientes de cinco bacias hidrográficas brasileiras: Amazônia (4♀ e 2♂), Araguaia (7♀ e 5♂), Paraguai (8♀ e 7♂), Alto Paraná (4♀ e 4♂) e São Francisco (21♀ e 22♂).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, por meio das técnicas descritas por Bertollo et al. (1978), Foresti et al. (1993) e Blanco et al. (2012). Foram utilizados como sondas sequência telomérica, oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites, repetições (GATA)_n e histonas H3 e H4.

O DNA telomérico (TTAGGG)_n foi amplificado, via PCR, utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991); a sequência de microsátélite (GATA)_n foi obtida com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Epplen et al. 1982.); a sequência da histona H3 foi obtida pelos primers H3F (ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC) e H3R (ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC) (Colgan et al. 1998) e H4 foi obtida pelos primers H4F2Er (GTIACIGTCTTSCKYTTGGCGTGCTC) e H4F2s (TSCGI-GAYAACATYCAGGGIATCAC) (Pineau et al. 2005). A edição das sequências de H3 e H4 foi realizada com o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (Hall, 1999). Foi utilizado o BLAST (Altschul et al. 1990) na identificação de similaridade destas sequências.

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 16 - dUTP (para as sondas telomérica e GATA) e digoxigenina 11 - dUTP (para as sondas H3 e H4) (Roche). Os oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites: (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀, foram obtidos

através da síntese comercial pela Sigma, com marcação direta com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese.

As simples hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) foram realizadas segundo o protocolo de Pinkel et al. (1986), para as sondas de sequência telomérica, repetições (GATA)_n e histonas H3 e H4, e segundo o protocolo de Kubat et al. (2008), para oligonucleotídeos enriquecidos com microsátélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀.

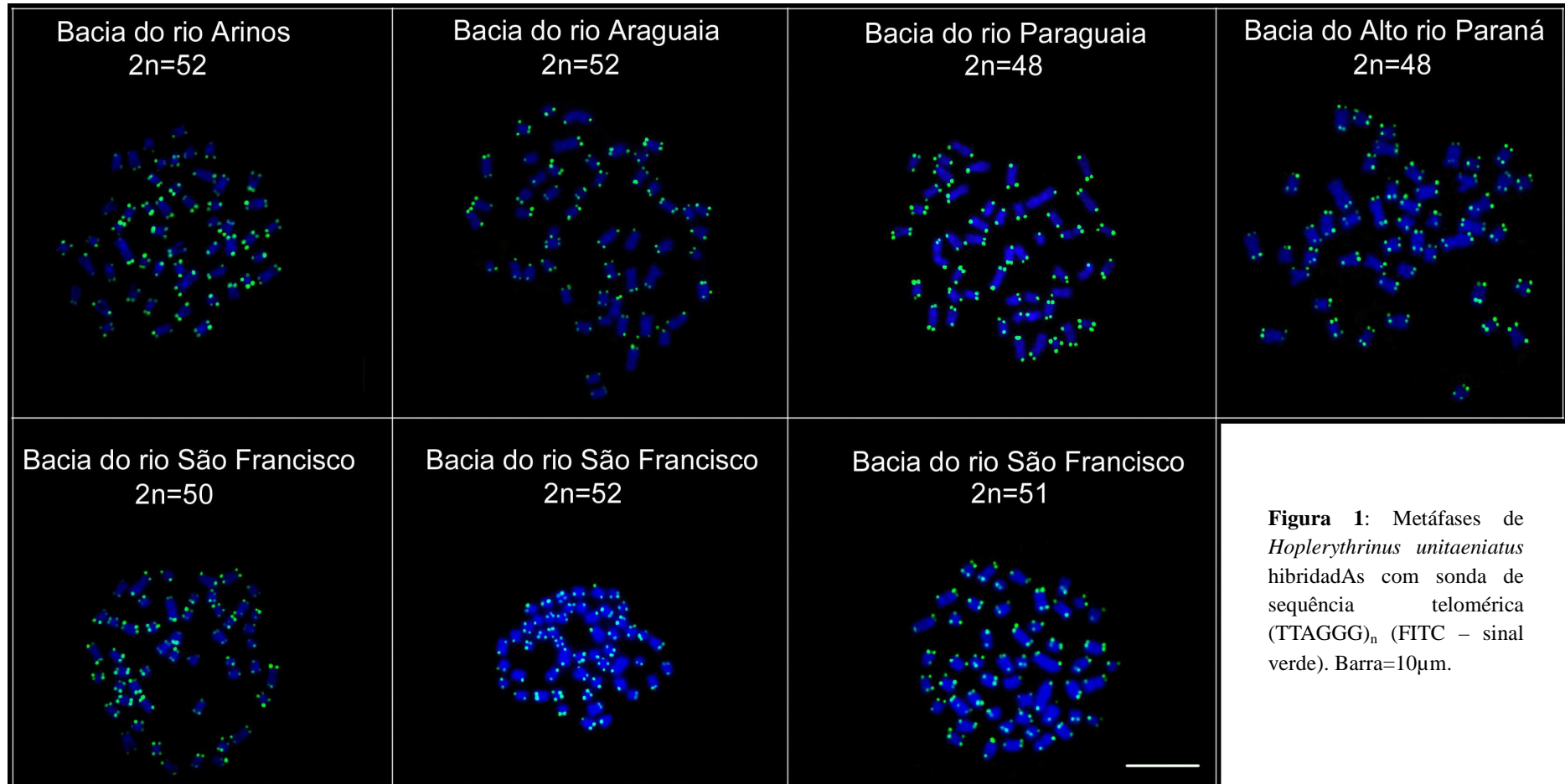
RESULTADOS

Assim como já relatado no capítulo II, os espécimes de *H. unitaeniatus* apresentaram 2n=48 (Paraguai e Alto Paraná), 2n=50 (São Francisco) e 2n=52 (Amazônia, Araguaia, São Francisco). Os espécimes híbridos com 2n=51 cromossomos encontrados na bacia do rio São Francisco (Capítulo I), também foram analisados.

A FISH com sonda de sequência telomérica (TTAGGG)_n detectou sítios restritos a porção terminal dos cromossomos em todas as populações, não sendo constatada a presença de ITS (*Interstitial Telomeric Sequences*) (Fig. 1).

A distribuição cromossômica dos microsátélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (GAG)₁₀ no genoma de *H. unitaeniatus* mostrou-se alocado preferencialmente em posição terminal dos cromossomos de todas as populações com algumas regiões intersticiais marcadas. Entre os elementos repetitivos analisados, o microsátélite (GAG)₁₀ foi o que apresentou menor intensidade dos sinais de hibridização, com menor acúmulo no genoma. Já o microsátélite (GATA)_n apresentou-se disperso pelos cromossomos de todas as populações analisadas, sem um acúmulo preferencial em uma região cromossômica específica (Fig. 2 e Fig. 3).

As sequências parciais de histonas H3 e H4 apresentaram 337pb (Fig. 4a) e 181pb (Fig. 4b), respectivamente. A sequência parcial de H3 de *H. unitaeniatus* apresentou similaridade com as sequências de outras espécies de peixes: 71% com *Pseudanthias squamipinnis* (Perciformes, Serranidae), *Serranus tigrinus* (Perciformes, Serranidae) e *Gasterosteus aculeatus* (Gasterosteiformes, Gasterosteidae). Para H4 foi verificado similaridade de 73% com *Sternopriscus multimaculatus* (Coleoptera, Dytiscidae), *Sternopriscus williamsi* (Coleoptera, Dytiscidae) e *Takifugu rubripes* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). As sondas de histonas H3 e H4 mostraram-se dispersa pelos cromossomos de *H. unitaeniatus*, com marcação terminal mais forte na maioria dos cromossomos, além disso, marcações intersticiais também foram encontradas, principalmente para H4 (Fig. 5 - H3 e Fig. 6 - H4).



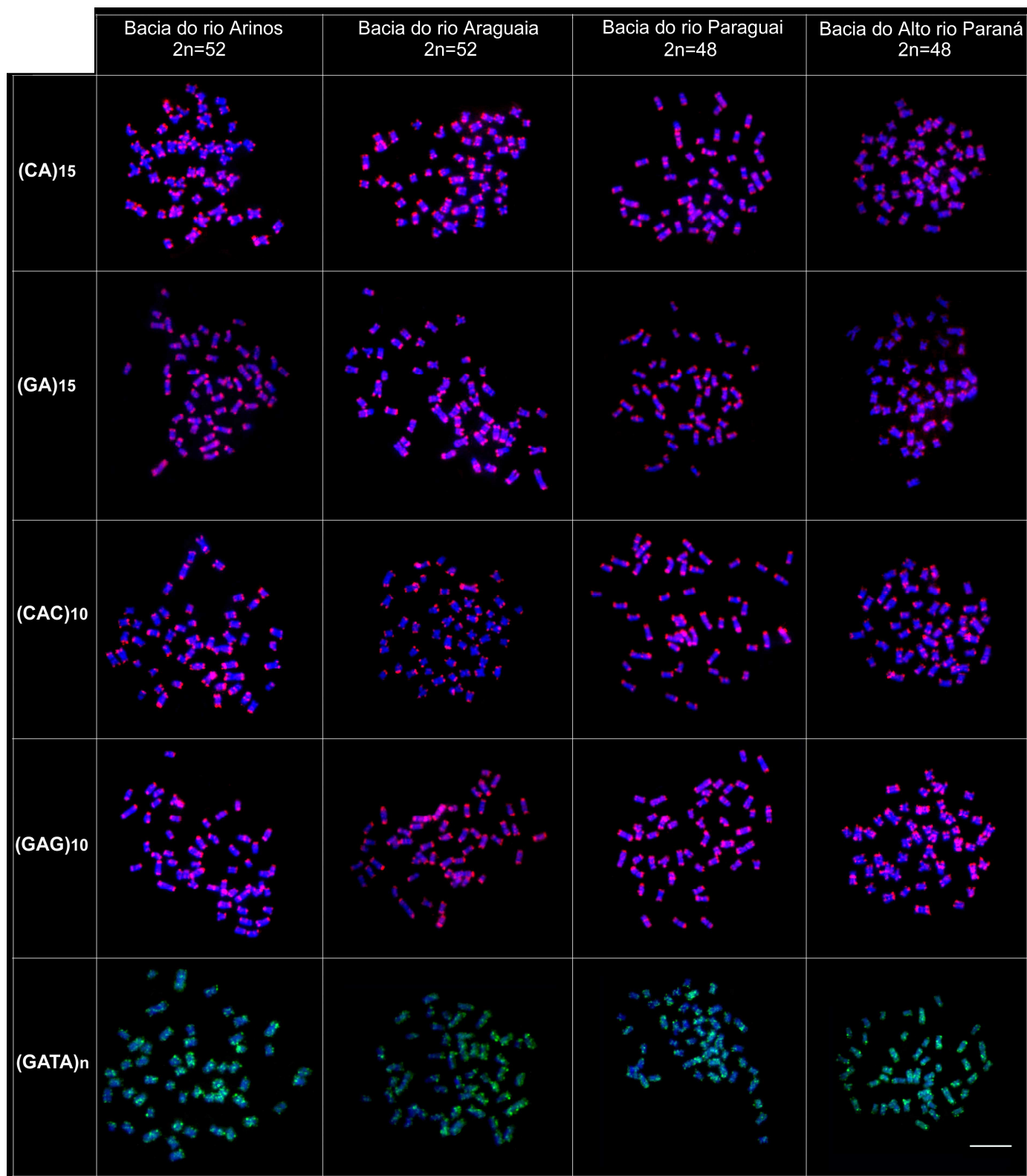


Figura 2: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* hibridadas com sondas de microsátélites (Cy3 – sinal vermelho e FITC – sinal verde) Barra=10 μ m.

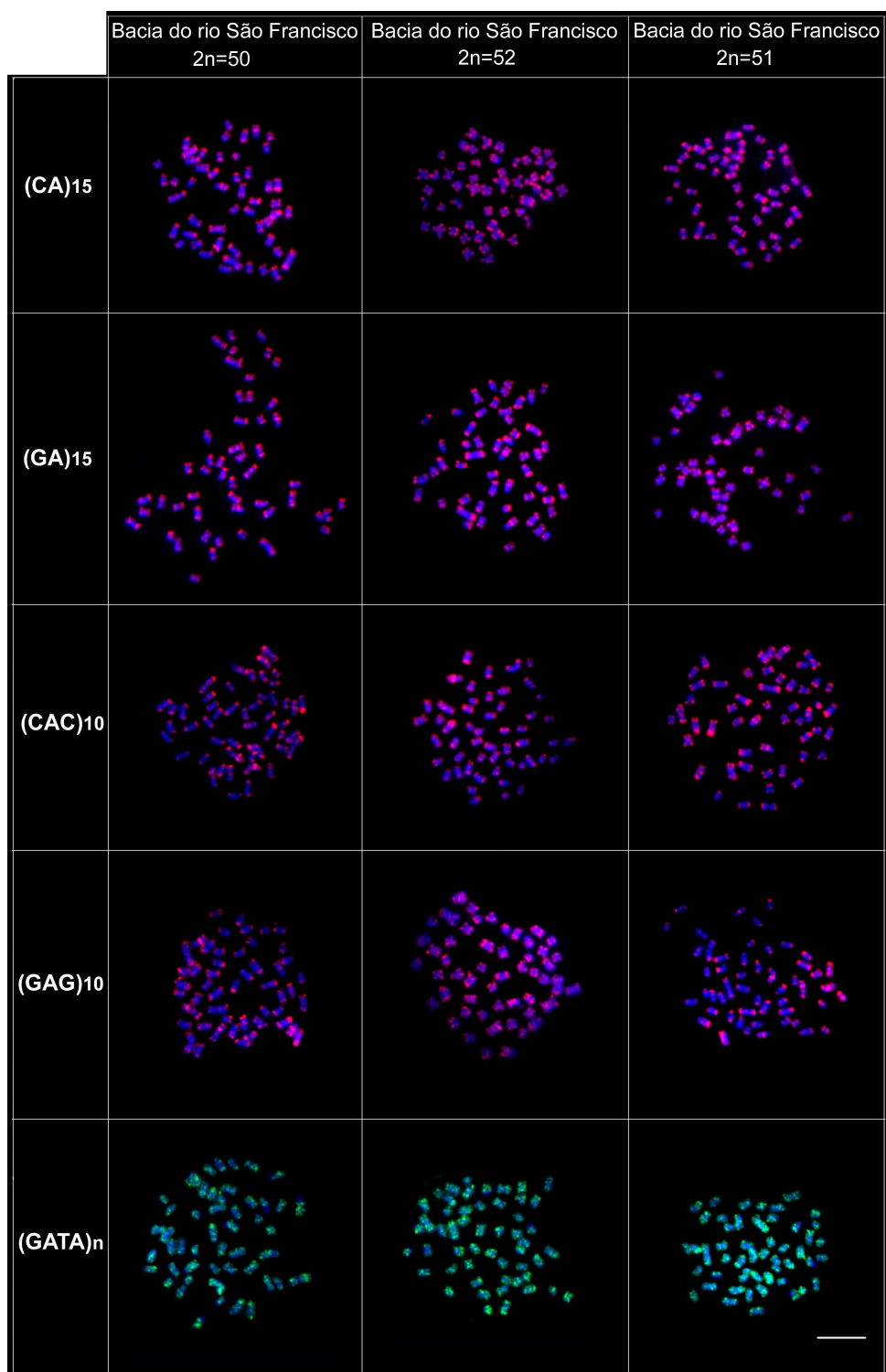


Figura 3: Metáfases de *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes da bacia do rio São Francisco hibridadas com sondas de microsátélites (Cy3 – sinal vermelho e FITC – sinal verde). Barra=10µm.

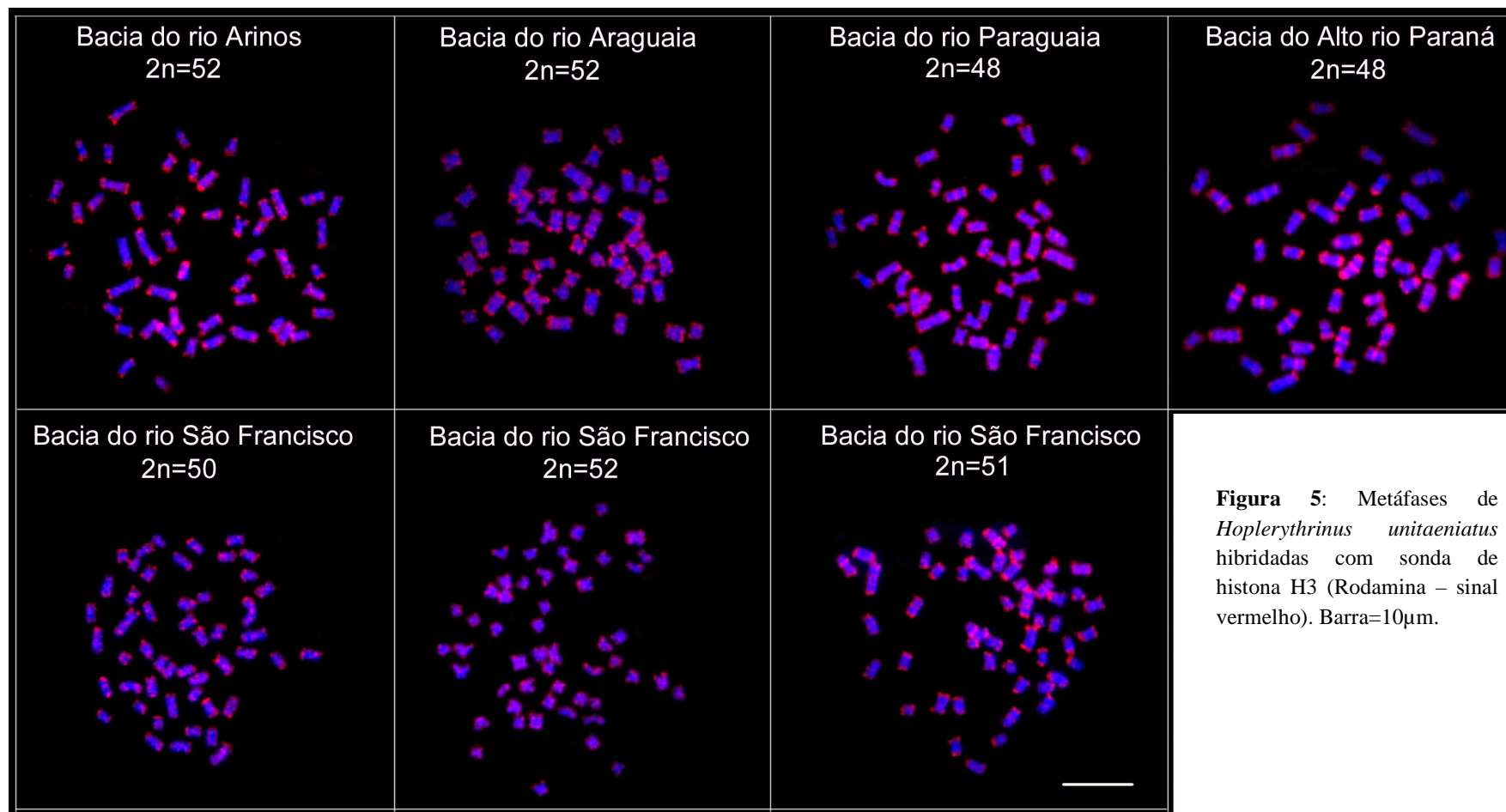
Sequência Parcial de Histona H3**a**

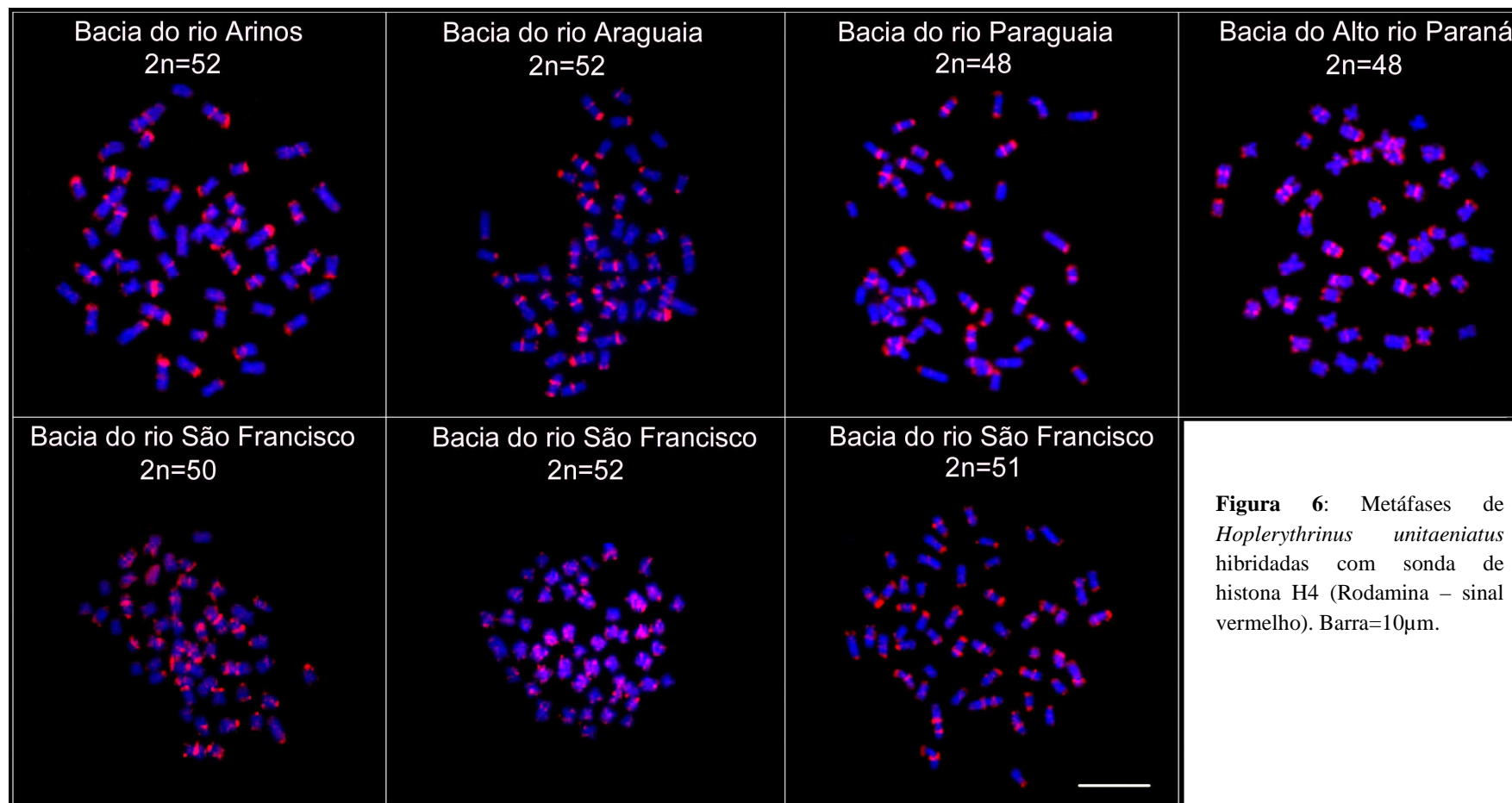
GGACTGCGCAAGATCGAGTAGCAACAGACCACCAGTAAGCCTCGCAAGACC
 CCTCCAGAGGTGAAGAATCCTCATCGAAACGGAGACCGGTACTGAAGCCCT
 AAACGAGATCACGCACCAGAAACCGAAAGAGCAGCTCACCCACAAGCAGC
 CCAGCAAACGCCTGGTAGCGGCAGATCGCGCAGAAAGCCAAAACCCAGCG
 CCGCTAACAAAGAGCCGCGTCACGGCCCGCCAGGAGCCGGAGCGAAGCTT
 ACGAGGCAGCTCTAGTAGACAACACCAACCTCGGCGCCATCCACACCAAGA
 GA GTCACGAGCAGTATGCCCAAACGAGACAAAA

Sequência Parcial de Histona H4**b**

CGCAATCGCGTCTAGCGCGCCCAGTGGAGTGACCGCATCTCTGATCACGAT
 CTACAAGAACACACGCAGCACCCCAAAGGTCTCCCCGGAGAACATGACCAG
 AGACACGCGTCACACAAACACAACAAGCCAAAAGGAAGACAGTCACCGCC
 ATGGACATCCCCTGAACGCCCTCAAGAAA

Figura 4: Sequências parciais das histonas H3 (a) e H4 (b).





DISCUSSÃO

Os DNAs repetitivos eram comumente denominados como ‘selfish’ ou ‘junk DNA’ por não acarretarem nenhuma contribuição biológica ao genoma (Martins et al 2007). Entretanto, atualmente já se sabe de diferentes funções atribuídas a esses DNAs e a análise de seqüências vem sendo cada vez mais utilizadas. Para peixes, a análise de seqüências repetitivas leva a dados consistentes que ajudam na melhor compreensão da evolução e mapeamento de genomas de determinadas espécies (Ferreira et al. 2011), auxiliam na elucidação de relações filogenéticas (Teixeira et al. 2009) e problemas taxonômicos (Blanco et al. 2011), diversificação e evolução de cromossomos sexuais (Vicari et al. 2008), origem de cromossomos B (Jesus et al. 2003), diferenciações populacionais (Martinez et al. 2011), relações biogeográficas (Vicari et al. 2005), entre outros. Em *H. unitaeniatus*, até o presente trabalho, os estudos com seqüências repetitivas eram restritas somente as seqüências DNA ribossomais 18S e 5S (Diniz e Bertollo, 2003 e 2006; Da Rosa et al. 2012; Capítulo I e II).

Telômeros são seqüências de DNA encontradas na região terminal dos cromossomos, as quais são compostas pela repetição (TTAGGG)_n e estão presentes em todos os vertebrados (McEachern et al. 2000). A presença desta seqüência na porção terminal do cromossomo é essencial para a manutenção da integridade e estabilidade cromossômica, além de ser necessária no processo de replicação (Blackburn, 2001). Sítios teloméricos presentes tanto em posição terminal quanto intersticial (ITS - Interstitial Telomeric Site) nos cromossomos podem dar indícios sobre a evolução daquela espécie. Para *H. unitaeniatus*, em todas as populações analisadas, tal seqüência apresentou-se restrita à porção terminal dos cromossomos, sem a presença de ITS.

Considerando os espécimes portadores de $2n=48$ e $2n=50$ (para posterior aumento do número diplóide) como basais para o grupo, não seria esperado a ocorrência de ITS, pois houve um aumento do número diplóide no grupo acompanhado de eventos de fissão. Já considerando como basal os espécimes

com $2n=52$ e $2n=50$ (para posterior diminuição do número diplóide), seria esperado que as populações do Paraguai e Alto Paraná apresentassem ITS, devido ao processo de fusão para a redução do número diplóide, contudo nenhum sítio telomérico intersticial foi detectado. A ocorrência de uma fusão requer que os telômeros sejam inativados ou até mesmo eliminados, afim de que os cromossomos percam sua estabilidade e assim se fundam (Slijepcevic, 1998). Desse modo, pode ter ocorrido fusão cromossômica de cromossomos acrocêntricos/telocêntricos no grupo após a eliminação de seus telômeros, aumentando assim o número de cromossomos metacêntricos no cariótipo e reduzindo o número diplóide. Casos assim já foram relatados para outros grupos de peixes, como no caso de *Imparfinis hollandi* (Margarido e Moreira-Filho, 2008). Entretanto, vale ressaltar que a presença de ITS também não é difícil de ser encontrada em determinados grupos de vertebrados. Há casos em que fusão cromossômica ocorre permanecendo resquícios de sequência telomérica na região intersticial desses cromossomos, como o encontrado em outros grupos de peixes como *Harttia* (Blanco et al. 2012b), *Rineloricaria* (Rosa et al. 2012), *Ageneiosus* (Lui et al, 2013).

Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) geralmente contém de 1 a 6 pares de base (pb), repetidas de 5 a 100 vezes em cada locus (Epplen e Epplen-Haupt, 2002). São frequentemente distribuídos ao acaso pelo genoma e possuem elevado grau de polimorfismo (Martins et al. 2011). Os microsatélites apresentam comumente uma marcação diferencial em cromossomos sexuais, como é possível observar em outros membros de Erythrinidae portadores de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos como *Hoplias malabaricus* (Cioffi et al. 2011) e *Erythrinus erythrinus* (Martins et al. 2012). *H. unitaeniatus* não possui sistema de cromossomos sexuais diferenciados, desse modo, os microsatélites apresentaram um padrão de distribuição uniforme pelos cromossomos, sem acúmulo preferencial em algum cromossomo. Segundo Martins et al. (2007), os microsatélites encontram-se alocados principalmente em regiões centroméricas e teloméricas, porções cromossômicas geralmente

ricas em heterocromatina. Para *H. unitaeniatus* foi possível verificar esse acúmulo principalmente na região terminal dos cromossomos. Estudos com microsátélites no genoma de peixes ainda são escassos. Vanzela et al. (2002), utilizando o microsátélite $(GA)_n$ nas espécies de peixe *Imparfinis schubarti*, *Steindachneridion scripta* e *Rineloricaria latirostris* também encontrou um padrão de acúmulo preferencial em regiões cromossômicas terminais. O microsátélite com repetições $(GATA)_n$, o qual é o maior componente do DNA satélite Bkm (Banded Krait Minor), foi o único que se apresentou disperso pelos cromossomos, sem acúmulo preferencial em uma região cromossômica. O mesmo ocorreu para quatro espécies do gênero *Hypostomus* (Traldi et al. 2013) e para a espécie *Ageneiosus inermis* (Lui et al. 2013), que também não apresentam cromossomos sexuais, mas possuem esta sequência dispersas pelos autossomos.

As histonas são codificadas por famílias que variam entre 100 e 1000 genes (Griffiths et al. 2006). São classificadas em histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 e estão envolvidas na compactação do DNA para formação do nucleossomo. A estrutura dessas proteínas é altamente conservada, principalmente a H3 e H4, entre as diversas classes de animais, embora variações já tenham sido encontradas (Martins et al. 2011). Estudos já realizados com histonas H3 e H4, mostram que esses cístrons encontram-se alocados em um ou poucos pares cromossômicos, como observado em *Astyanax bockmanni* para H3 e H4 (Silva et al. 2013), *Astyanax fasciatus* (H3) (Pansonato-Alves et al. 2013a) e algumas espécies de *Hypostomus* (H3) (Pansonato-Alves et al. 2013b).

Para o genoma de *H. unitaeniatus* foi verificado a presença das sequências de histonas com um padrão de distribuição disperso com acúmulo em regiões terminais e intersticiais (principalmente H4), sendo que essas regiões são coincidentes com porções heterocromáticas. Esse padrão de distribuição é possível devido a sua associação com transposons e retrotransposons, os quais apresentam como principal característica a mobilidade dentro do genoma (Hartl et al. 1992), contudo não foi verificada a

presença desses elementos nas sequências obtidas. Este fato não descarta a hipótese de que em algum momento essas sequências de histonas estiveram associadas a elementos transponíveis, visto que estes apresentam um ciclo de vida muito rápido e após se propagarem pelo genoma, podem ser silenciados ou até mesmo eliminados (Pinsker et al. 2001). Alternativamente, esse padrão de distribuição das histonas, associados a regiões heterocromáticas, as quais são co-localizadas na maioria dos cromossomos, pode ter se originado em função da disposição dos cromossomos no núcleo durante a replicação (Schweizer e Loidl, 1987), no qual a heterocromatina pode ser transferida tanto entre cromossomos homólogos quanto entre não homólogos, apresentando-se co-localizada em muitos cromossomos (Iñigo et al. 1996).

Este é o primeiro estudo utilizando diferentes marcadores de DNA repetitivo no genoma de *H. unitaeniatus*, os quais apresentaram um padrão de distribuição uniforme entre as diferentes populações, mostrando que essa espécie, apesar de ser cromossômicamente diversa, mantém um padrão de genoma conservado.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.1, n.2, p.103-120, 1978.

BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v.106, p.661-673, 2001.

BLANCO, D. R. et al. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, p.71–78, 2011.

BLANCO, D. R. et al. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v.81, p.351-357, 2012.

BLANCO, D. R. et al. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p.1-7, 2012b.

CHARLESWORTH, B.; SNEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v.371, p.215-220, 1994.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A. C. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias Malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, p.289-296, 2011.

COLGAN, D. J.; HUTCHUNGS, P. A.; BEACHAM, E. Multi-gene analyses of the phylogenetic relationships among the mollusca, annelid and arthropoda. **Zoological Studies**, v.47, n.3, p.338-351, 2008.

DA ROSA, R. et al. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.467-475, 2012.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. **Caryologia**, v.56, n.3, p.303-311, 2003.

DINIZ, D.; BERTOLLO, L. A. C. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.453-458, 2006.

EPPLEN, J. T. et al. Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.79, p.3798-3802, 1982.

EPPLEN, J. F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R. C.; OBE, G.; ATHWAL, R. S. (Ed.) **Some aspects of chromosome structure and functions**. Índia: Narosab Publishing House, 2002. 238p. 1-10.

FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome Mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, n.1-2, p. 64-70, 2011.

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

GRIFFITHS, J. F. et al. **Introdução à genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n.41, p.95-98, 1999.

HARTL, D. L.; LOZOVSKAYA, E.; LAWRENCE, J. G. Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. **Genetica**, v.86, p.47-53, 1992.

IJDO, J. W. et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.17, p.4780, 1991.

IÑIGO, R. E.; FERNÁNDEZ-CALVÍN, B.; GARCÍA DE LA VEGA, C. Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: in situ localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). **Heredity**, v.70, p.70-76, 1996.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Individual-specific fingerprints' of human DNA. **Nature**, v.316, p.76-79, 1985.

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

KUBAT, Z. K. Z. et al. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v.51, p.350-356, 2008.

LUI R. L. et al. The role of chromosomal fusion in the karyotypic evolution of the genus *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae). **Neotropical Ichthyology**, v.11, p.327-334, 2013.

MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.235-238, 2008.

MARTINEZ, J. F. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**, v.64, n.1, p.121-128, 2011.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E. et al. (Ed.) **Fish Cytogenetics**. New Hampshire: Kapoor Science Publisher, 2007. 502p. 421-453.

MARTINS, C. et al. **Animal Genomes Under the Focus of Cytogenetics**. New York: Nova Science Publishers, 2011. 160p.

MARTINS, N. F. et al. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.23, p.261-269, 2012.

MCEACHERN, M. J.; KRAUSKOPF, A.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and their control. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.331-358, 2000.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R. E.; SVEN, O. K.; FERRARIS Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p. 238-240.

PANSONATO-ALVES, J. C. et al. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.141, p.133-142, 2013a.

PANSONATO-ALVES, J. C. et al. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.23, p.477-489, 2013b.

PINEAU, P. et al. A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.3, p.582-588, 2005.

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

PINSKER, W. et al. The evolutionary life history of *P* transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. **Chromosoma**, v.110, p.148-158, 2001.

ROSA, K. O. et al. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.739-749, 2012.

SCHUWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. In: STAHL, A.; LUCIANI, J. M.; VAGNER-CAPODANO, A. M. (Ed.) **Chromosomes Today**. London: Allen & Unwin, 1987. 317p. 61-74.

SILVA, D. M. Z. A. et al. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, v.141, p.329-336, 2013.

SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**, v.76, p.67-112, 1982.

SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v.107, p.136-140, 1998.

TRALDI, J. B. et al. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Genetics**, v.92, n.1, p.127-130, 2013.

TEIXEIRA, W. G. et al. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.125, p.224–234, 2009.

VANZELA, A. L. L. et al. Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia**, v.67, p.9-13, 2002.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.103-110, 2005.

VICARI, M. R. et al. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). **Genetica**, v.134, p.311–317, 2008.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Hoplerythrinus* é composto por três espécies: *H. unitaeniatus*, *H. gronovii* e *H. cinereus*. Dentre estas, *H. unitaeniatus* é a única espécie desse gênero que possui estudos cromossômicos.

Os números diplóides encontrados em *H. unitaeniatus* são $2n=48$, $2n=50$ e $2n=52$ cromossomos. De acordo com a revisão de cariomorfos realizados no presente estudo, essa espécie é classificada em cinco cariomorfos distintos (A – E). Os cariomorfos A, B e E apresentam $2n=48$ cromossomos e são encontrados na bacia do rio Amazonas (A e B), Paraguai (A) e Paraná (E). O cariomorfo C apresenta $2n=52$ cromossomos e é encontrado nas bacias do Leste e do São Francisco. Por fim, o cariomorfo D apresenta $2n=50$ cromossomos e é endêmico da bacia do rio São Francisco. Na bacia do rio Francisco espécimes com 50 e 52 cromossomos são encontrados em simpatria, com formação de híbridos naturais com $2n=51$ cromossomos e distintas formas cariotípicas, possivelmente devido à introgressão existente entre esses espécimes.

H. unitaeniatus possui características cromossômicas variáveis, como número diplóide, morfologia cromossômica e número de sítios de AgRONS (podendo ser simples ou múltiplos, e localizados em diferentes posições). A hibridização *in situ* fluorescente mostrou um número elevado de cromossomos marcados, padrão este semelhante ao observado para outras espécies de Erythrinidade. Além disso, sítios sintênicos de DNAr 18S e 5S puderam ser observados em todas as populações analisadas, sendo possivelmente, uma característica basal para Erythrinidae.

Dentre as características conservadas desta espécie, destaca-se o padrão de distribuição heterocromático, onde blocos conspícuos de heterocromatina são preferencialmente encontrados em posição intersticial na maioria dos cromossomos de todas as populações estudadas. Os primeiros estudos de mapeamento físico com sondas de microsatélites $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(CAC)_{10}$, $(GAG)_{10}$ e $(GATA)_n$ e

histonas (H3 e H4) para *H. unitaeniatus* realizados no presente trabalho também mostraram um padrão de distribuição genômico conservado para a espécie.

Os estudos até agora realizados com *H. unitaeniatus* sugerem que tanto os espécimes com $2n=48$ quanto os com $2n=52$ cromossomos podem ser considerados como condições basais para o grupo. Além disso, também não se pode deixar de considerar a hipótese de que os espécimes com $2n=50$ cromossomos, endêmicos da bacia do São Francisco também sejam basais para o grupo, podendo ter ocorrido duas linhagens evolutivas distintas para esses espécimes, dando origem tanto a espécimes com $2n=48$ quanto com $2n=52$ cromossomos.

Com os dados até agora disponíveis para o gênero *Hoplerythrinus* não é possível determinar realmente a condição ancestral para o grupo, entretanto com os estudos realizados até o momento com *H. unitaeniatus* o mais plausível é considerar $2n=48$ cromossomos como condição ancestral, pois a ocorrência deste número diplóide em diferentes Escudos (Escudo Brasileiro e Escudo das Guianas), os quais apresentam espécies de peixes que representam grupos muito antigos, com distribuições relictuais, corrobora fortemente para esta hipótese. Estudos com as outras espécies de *Hoplerythrinus*: *H. gronovii* e *H. cinereus*, que ocorrem em Trinidad e Tobago e Guiana Francesa, respectivamente, seria de grande importância para se determinar realmente a condição basal para este gênero.

Todos os estudos já realizados vêm demonstrando a variabilidade cromossômica existente nesta espécie e os dados obtidos neste trabalho vêm reforçar a hipótese de que *H. unitaeniatus* não se trata de uma única espécie, mas sim do complexo de espécies *H. unitaeniatus*.