



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Evolução cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes).
Citogenética comparativa entre espécies do gênero *Hoplias*.**

Ezequiel Aguiar de Oliveira

SÃO CARLOS – SP

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Ezequiel Aguiar de Oliveira

Evolução cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes).
Citogenética comparativa entre espécies do gênero *Hoplias*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Genética e Evolução

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

SÃO CARLOS – SP
2015

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

O48ec De Oliveira, Ezequiel Aguiar.
Evolução cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes). Citogenética comparativa entre espécies do gênero *Hoplias* / Ezequiel Aguiar De Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
58 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Peixe. 2. Evolução cariotípica. 3. DNA repetitivo. 4. Cromossomos. 5. Especiação. I. Título.

CDD: 597 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Relatório de Defesa de Dissertação
Candidato: Ezequiel Aguiar de Oliveira

Aos 29/06/2015, às 09:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Evolução Cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes). Citogenética comparativa entre espécies do gênero Hoplias, apresentada pelo candidato Ezequiel Aguiar de Oliveira. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam

Função Instituição
Presidente UFSCar
Titular UFSCar
Titular UFV

Conceito
A" LAVOR
A" LAVOR
A" LAVOR

Resultado Final: A" LAVOR

Parecer da Comissão Julgadora*:

TODOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA CONSIDERARAM O CONSTATO APROVADO COM CONCEITO "A" E DISTINÇÃO DE LAVOR.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Handwritten signature of Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

Handwritten signature of Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Handwritten signature of Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam

Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam

Handwritten signature of Ivanildes Menezes

Representante do PPG: Ivanildes Menezes

() Não houve alteração no título da dissertação () Houve. O novo título passa a ser:

CONFERE COM O ORIGINAL
Data: 03, 07, 2015

Ivanildes Regina de Menezes
Assistente em Administração Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular / UFSCar



Observações:

- a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Identificação Bibliográfica

Nome e sobrenome: **Ezequiel Aguiar de Oliveira**

Título da Tese: **Evolução cromossômica em peixes da família Erythrinidae (Characiformes). Citogenética comparativa entre espécies do gênero *Hoplias*.**

Título da tese em Inglês: **Chromosomal evolution in the Erythrinidae fish Family (Characiformes). Comparative cytogenetics among *Hoplias* species.**

Programa de estudo: Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

Ano de início: 2014

Ano da defesa: 2015

Palavras-chave: Cromossomos, Evolução cariotípica, Peixes, DNAs repetitivos, Especiação.

Keywords: Chromosomes, Karyotype evolution, Fishes, Repetitive DNAs, Speciation.

Dedico este trabalho à memória de minha mãe
Amélia Luiz de Aguiar, mulher de valor inestimável
que durante toda a sua vida incentivou e contribuiu
imensuravelmente com minha educação.

“As dificuldades da vida que em primeira impressão nos atrapalham, são na verdade desafios que nos tornam fortes preparando-nos para alcançar os objetivos almejados”.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que diretamente ou indiretamente contribuíram com a produção deste trabalho.

Primeiramente a Deus, pela força espiritual que me auxilia nos momentos de angústias e dificuldades.

A toda a minha família, em particular à minha esposa Aldeci Moura da Silva e meus filhos Alan Moura de Oliveira e Luana Moura de Oliveira que estiveram comigo incentivando-me e auxiliando-me nas horas difíceis deste caminhar.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso (SEDUC-MT), pela licença para qualificação profissional concedida, proporcionando condições para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pela infraestrutura disponibilizada para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que muito contribui para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, professor e pesquisador extremamente competente que muito eu admiro, que me recebeu com muita atenção e carinho em seu laboratório e proporcionou-me as melhores condições possíveis de conhecimento, aprendizagem e crescimento como pesquisador.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello de Bello Cioffi, pesquisador muito competente, dinâmico e organizado que contribuiu muito com meu aprendizado e com a realização deste e de vários outros trabalhos realizados no Laboratório.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pelos ensinamentos, orientações e a amizade.

À futura Dra. Cassia Fernanda Yano, pelos ensinamentos, contribuições e momentos de descontração durante as atividades realizadas no laboratório.

Ao Dr. Oswaldo T. Owakawa, taxonomista do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pela identificação dos exemplares de eritrínídeos.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas que auxiliaram nas coletas e me incentivaram a realizar este curso, em especial a Jeremias Antônio de Oliveira (Jereba), Ananias Antônio de Oliveira (Nana), Zacarias Antônio de Oliveira (Zaca), Joel Antônio de Oliveira, Amelí Antônio de Oliveira, Silvânia Antônio

de Oliveira, e Zisa Antônio de Oliveira, irmãos e amigos que sempre me incentivam e estiveram comigo auxiliando nas coletas e processamentos de exemplares de eritrínídeos na Fazenda Morro do Espia, no estado de Goiás e em outros locais dos estados do Tocantins e do Pará.

Agradeço especialmente à minha irmã Alícia Antônio de Oliveira, pois todas as conquistas alcançadas só foram possíveis devido a sua interferência positiva na minha vida iniciada há muitos anos atrás.

Ao meu sogro e amigo Manoel Moura da Silva, que me apoiou na decisão de realizar este curso e também contribuiu diretamente, juntamente com meu tio Serafim Moura da Silva, na captura dos trairões *Hoplias aimara* no município de Querência – MT.

Aos amigos e técnicos do laboratório, Piau, Toninho e Galo, pelos momentos de descontração e pelo suporte aos meus trabalhos no laboratório e em campo.

Aos meus amigos Ramiro Fabiano Melo, Alex Pablo Schirimbeck, Leonor (transão), Samuel Silva Chaves (samuca), Elismar Rodrigues da Silva, Juracy da Silva (Neguito), José Magalhães (Maga), Josimar do correio, Iber (Gauchão), Luiz Carlos (Carote), Roni, Cleiton Almeida da Silva (cleitim), Valdemar (bebezão), Jorge Arruda e João Fernando Feitosa dentre outros que incentivaram e de alguma maneira contribuíram com esta realização.

Aos meus cunhados Moacir e Valneir que me auxiliaram no transporte de exemplares de eritrínídeos utilizados na pesquisa.

À piscicultura Aquaminas e ao seu proprietário Sr. José Salles Alvim Junior, que doou alguns exemplares de *Hoplias intermedius* e *Hoplias lacerdae* para a realização desta pesquisa.

Ao senhor Florêncio Gomes Batista, que nos recebeu em sua casa e nos auxiliou na coleta de exemplares de *Hoplias brasiliensis* em Cristália - MG.

Agradeço também a várias outras pessoas que passaram pela minha vida e de certa forma também contribuíram com a realização deste trabalho, professores, colegas acadêmicos, amigos e familiares.

Muitíssimo obrigado a todos.

RESUMO

A família Erythrinidae é um pequeno grupo de Characiformes Neotropicais, compreendendo apenas três gêneros, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. *Hoplias malabaricus*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Erythrinus erythrinus* devem corresponder a grupos de espécies, considerando a ampla diversidade cromossômica que apresentam, incluindo diferentes sistemas de cromossomos sexuais. Assim sendo, os peixes eritrinídeos oferecem excelentes oportunidades para investigações evolutivas, dadas as particularidades diversas entre seus representantes. Estudos recentes possibilitaram a caracterização taxonômica de seis espécies de *Hoplias* ainda pouco ou não estudadas (*H. aimara*, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. curupira*) presentes em diversas bacias hidrográficas do continente sul-americano, dentre as quais se encontram espécimes popularmente conhecidos por trairões devido ao seu grande porte. O presente estudo buscou caracterizar a evolução cromossômica ocorrida nesse grupo particular de espécies, à luz das suas recentes revisões e identificações taxonômicas. Para esta finalidade, além de análises cromossômicas clássicas, foi empregado o mapeamento citogenético de sequências repetitivas de DNA por hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Os resultados mostraram o compartilhamento de uma grande homogeneidade na macroestrutura cariotípica das espécies analisadas, com $2n=50$ cromossomos e cariótipos compostos apenas por cromossomos meta- e submetacêntricos, sem a presença de cromossomos sexuais diferenciados entre os sexos. Por sua vez, a microestrutura cariotípica, revelada pela análise de componentes da fração repetitiva do genoma, evidenciou diferenciações interespecíficas, corroborando assim a recente revisão taxonômica dessas espécies com base em suas características morfológicas. Tal cenário evolutivo, destacando a conservação da macro-estrutura cromossômica, contrasta acentuadamente com o cenário presente em representantes do grupo *Hoplias malabaricus*, onde uma conspícua variação cromossômica pode ser observada entre distintas populações desta “espécie nominal”. Aspectos ecológicos relacionados ao modo de vida, bem como características cromossômicas intrínsecas, podem estar influenciando a coexistência desses modelos contrastantes de evolução cromossômica entre espécies congêneras de *Hoplias*.

ABSTRACT

The Erythrinidae family is a small group of Neotropical Characiformes, comprising only three genera, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* and *Erythrinus*. *Hoplias malabaricus*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Erythrinus erythrinus* must correspond to groups of species, considering the extensive chromosomal diversity that they present, including different sex chromosomes systems. Therefore, these fishes offer excellent opportunities for evolutionary investigations, given the different chromosomal characteristics between their representatives. Recent studies allowed the taxonomic characterization of six poorly or not studied *Hoplias* species (*H. aimara*, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* and *H. curupira*), present in several South American river basins' and popularly known as "trairões" due to their large size. This study aimed to characterize the chromosomal evolution occurred in this particular group of species, in the light of its recent review and taxonomic identifications. For this purpose, in addition to classical chromosomal analysis, cytogenetic mapping of repetitive DNA sequences using specific probes was used for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The results showed the sharing of a great homogeneity in the species' karyotype macrostructure, with $2n = 50$ and karyotypes composed only by meta- and submetacentric chromosomes without the presence of differentiated sex chromosomes between the sexes. In turn, the karyotype microstructure, as revealed by the analysis of components of the repetitive fraction of the genome showed interspecies differentiation, thus confirming the recent taxonomic revision of these species based on their morphological characteristics. This evolutionary scenario, highlighting the conservation of chromosomal macro-structure, sharply contrasts with the scenario found in the representatives of *H. malabaricus* group, where a conspicuous chromosomal variation can be observed between different populations of this "nominal species." Environmental aspects related to the way of life, as well as intrinsic chromosomal features, may influence the coexistence of these contrasting models of chromosomal evolution among congeneric species of *Hoplias*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ideograma representativo dos diferentes cariomorfos encontrados na espécie *Hoplias malabaricus*, com apresentação dos diferentes tipos de sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2012)..... 07
- Figura 2.** Ideograma representativo das características cariotípicas de representantes do grupo *Hoplias lacerdae*, evidenciando a localização da heterocromatina C-positiva, da NOR, assim como de bandas argentofílicas e CMA₃ positivas nos cromossomos (modificado de Morelli et al., 2007)..... 09
- Figura 3.** Locais de origem das espécies de *Hoplias* analisadas no presente estudo. (1) *H. aimara*, (2) *H. brasiliensis*, (3) *H. intermedius* e (4) *H. lacerdae*. O círculo em preto representa a localização da estação de piscicultura no estado de Minas Gerais, fornecedora dos exemplares de *H. lacerdae* e *H. intermedius*. Figura modificada de <http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=27049>, acessado em 19 de abril de 2015..... 13
- Figura 4.** Fotos das espécies de *Hoplias* analisadas no presente trabalho..... 14
- Figura 5.** Cariótipos de *Hoplias intermedius* e *Hoplias brasiliensis* com coloração Giemsa convencional (a) e após Bandamento C (b) apresentando 2n=50 cromossomos. (c) e (d) mostram metáfases destas espécies, coradas com DAPI (c) e Cromomicina A₃ (d), com destaque para os sítios CMA₃⁺, ricos em GC nos cromossomos. Em (e) são apresentadas fotos dos espécimes. Barra = 5 µm..... 41
- Figura 6.** Cariótipos de *Hoplias lacerdae* e *Hoplias aimara* com coloração Giemsa convencional (a) e após Bandamento C (b) apresentando 2n=50 cromossomos. (c) e (d) mostram metáfases destas espécies, coradas com DAPI (c) e Cromomicina A₃ (d). As setas indicam os sítios CMA₃⁺, ricos em GC nos cromossomos. Em (e) são apresentadas fotos dos espécimes. Barra = 5 µm..... 42

Figura 7.	Placas metafásicas de <i>Hoplias intermedius</i> mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ e (CAA) ₁₀ . Observar o padrão de distribuição geral de microssatélites e a presença de sítio mais conspícuos de (CAA) ₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.....	43
Figura 8.	Placas metafásicas de <i>Hoplias aimara</i> mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ e (CAA) ₁₀ . Observar o padrão de distribuição geral dos microssatélites e a presença de sítios mais conspícuos de (CAA) ₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.....	44
Figura 9.	Placas metafásicas de <i>Hoplias lacerdae</i> mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ e (CAA) ₁₀ . Barra = 5µm.....	45
Figura 10.	Placas metafásicas de <i>Hoplias brasiliensis</i> mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ e (CAA) ₁₀ . Observar o padrão de distribuição geral dos microssatélites e a presença de sítio mais conspícuos de (CAA) ₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.....	46
Figura 11.	Resumo das principais características cromossômicas das espécies de <i>Hoplias</i> investigadas no presente estudo.....	47
Figura 12	Padrão cariotípico conservativo (I) compartilhado por diferentes espécies de <i>Hoplias</i> , contrastando com cariótipos altamente divergentes (II) apresentados por representantes de <i>H. malabaricus</i> , com 07 cariomorfos (AG) identificados. Em (II), cariomorfos presentes na mesma caixa compartilham características cromossômicas entre si, que diferem entre os dois conjuntos considerados.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados cariotípicos da família Erythrinidae, (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2011). Os dados para <i>H. aimara</i> foram obtidos de Blanco et al. (2011).....	05
Tabela 2. Espécies de <i>Hoplias</i> com seus locais de procedência, número de exemplares analisados e o registro de depósito no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - SP - Brasil.....	16
Tabela 3. Locais de procedência das espécies de <i>Hoplias</i> , com os respectivos tamanhos amostrais e códigos de identificação do museu.....	40

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Os DNAs repetitivos e o genoma dos peixes.....	01
1.2 - A família Erythrinidae.....	03
1.3 - O gênero <i>Hoplias</i>	06
II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	11
2.1 - Justificativa e objetivos.....	11
2.2 - Objetivos específicos.....	12
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 - Amostragens do material biológico.....	13
3.2 - Métodos.....	17
3.2.1 - Obtenção dos cromossomos mitóticos.....	17
3.2.2 - Estimulação mitótica.....	18
3.2.3 - Detecção da heterocromatina C-positiva.....	18
3.2.4 - Detecção das bandas cromossômicas GC-ricas.....	19
3.2.5 - Detecção das regiões organizadoras de nucléolos Ag-NOR.....	20
3.2.6 - Hibridização <i>In situ</i> (FISH).....	20
3.2.6.1 - As sondas.....	20
3.2.6.2 - Marcação das sondas.....	20
3.2.6.3 - Preparação das lâminas, hibridização e detecção do sinal.....	21
IV - ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	23
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
VII - BIOGRAFIA.....	51
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os DNAs repetitivos e o genoma dos peixes

O grupo dos peixes engloba aproximadamente 28 mil espécies, de um total de 55 mil espécies de vertebrados conhecidas (Nelson, 2006), sendo que a grande maioria das espécies se encontra na região tropical, diminuindo esta diversidade em direção às regiões temperadas e polares (Léveque et al., 2007). Esta grande diversidade biológica, morfológica e de habitats dificulta, de certa forma, o entendimento de sua história evolutiva, bem como de sua taxonomia (Cioffi et al., 2011). Apesar deste grupo biológico já ser objeto de estudos evolutivos há muitos anos, muitas investigações mais recentes têm dado destaque em aspectos genéticos e moleculares, com vários projetos de sequenciamento do genoma de diferentes espécies (Mayden et al., 2007).

Os estudos citogenéticos em peixes intensificaram-se a partir da década de 70. A partir daí se diversificaram e evoluíram através da elaboração de técnicas que utilizam conhecimentos de citologia, genética e biologia molecular, demonstrando avanços a partir do aprimoramento de técnicas convencionais já consolidadas (coloração com Giemsa, tratamento Ag-NORs e bandamento C), com metodologias mais resolutivas (bandamentos G, Q e R, coloração com corantes bases específicos A-T/G-C) e com a técnica de FISH (Hibridização “in situ” Fluorescente) utilizando diferentes tipos de DNAs repetitivos como marcadores (Almeida-Toledo, 1998).

De fato, o genoma dos peixes contém uma expressiva quantidade de DNAs repetitivos, tendo praticamente todas as diferentes classes já identificadas na maioria das espécies (Martins, 2007). DNAs repetitivos são componentes naturais da heterocromatina e cada espécie tem um conjunto específico de famílias de elementos repetitivos que estão preferencialmente localizadas nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos. Na verdade, a heterocromatina representa uma fração

notável do genoma, composta principalmente por uma variedade de sequências repetitivas acumuladas (Charlesworth, 1994). Os DNAs repetitivos podem se apresentar como elementos dispersos ou dispostos em *tandem*. Os elementos dispersos são representados por elementos de transposição (TEs) e estão amplamente distribuídos ao longo do genoma, ao passo que as sequências *em tandem* incluem as famílias multigênicas (tais como genes ribossomais e histonas) e os satélites (satDNAs), micro e minissatélites. O genoma dos eucariotos apresenta uma grande variação no conteúdo de DNAs repetitivos, que em muitos casos não apresenta relação direta com a complexidade dos organismos, nível de ploidia e quantidade de genes (Gregory, 2005). A princípio, por não se saber sua real função, este DNA foi considerado “DNA lixo”, entretanto, estudos adicionais têm sugerido que este tipo de DNA participa da organização estrutural e funcional dos cromossomos (Biémont & Vieira, 2006).

Em peixes, a distribuição cromossômica da heterocromatina tem sido extensivamente estudada por métodos citológicos, como o bandeamento C. Entretanto, dados moleculares sobre os DNAs repetitivos presentes na heterocromatina são ainda restritos a poucas espécies (Martins, 2007). A técnica de FISH tem sido amplamente utilizada no mapeamento cromossômico dos genes DNAr 18S e DNAr 5S, trazendo importantes informações para a caracterização da diversidade e evolução da ictiofauna brasileira (Almeida-Toledo, 1998; Oliveira et al., 2007).

Nos eucariotos superiores, O RNA ribossômico (RNAr) é representado por duas famílias multigênicas, ou seja, o DNAr 45S e o DNAr 5S. Essas duas famílias são constituídas por unidades que se repetem centenas a milhares de vezes no genoma. O DNAr 45S engloba os sítios de DNAr18S, DNAr 5,8S e DNAr 28S, os quais correspondem às Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs). Estes três sítios se encontram separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 E ITS2), e flanqueados pelos espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não transcritos (NTS) (Long &

David, 1980). Entre as espécies de peixes, as RONS se apresentam variáveis em número, posição e tamanho dos cístrons ribossômicos, mostrando-se altamente polimórficas (Foresti et al., 1981; Reed & Phillips, 1997; Gornung et al., 2013).

Os microssatélites, ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs), são também frequentes nos eucariotos, sendo assim denominados por serem constituídos por pequenas unidades (1-6 nucleotídeos) repetidas em *tandem*. Podem variar amplamente no número de repetições que apresentam, podendo atingir milhares de repetições e associados à heterocromatina em várias espécies (Martins, 2007). São comumente encontrados tanto entre as regiões codificantes de genes estruturais, como entre outras sequências repetitivas (Tautz & Renz, 1984). Diferentes classes de microssatélites têm se mostrado elementos importantes para a caracterização estrutural e funcional dos cromossomos (Plohl, 2010). De fato, entre os peixes tais elementos tem propiciado um melhor entendimento do processo evolutivo do genoma como um todo, assim como da diferenciação de cromossomos sexuais (revisado em Cioffi & Bertollo, 2012).

1.2. A Família Erythrinidae

Os peixes da família Erythrinidae encontram-se distribuídos em apenas três gêneros: *Hoplias* Gill, 1903; *Hoplerythrinus* Gill, 1895 e *Erythrinus* Scopoli, 1777 (Oyakawa, 2003). Popularmente são conhecidos como traíras ou trairões (*Hoplias*) e jejús (*Hoplerythrinus* e *Erythrinus*), encontrando-se praticamente presente na maioria da rede fluvial sul-americana (Oyakawa, 2003). Entretanto, é um grupo que apresenta sérios problemas de ordem taxonômica e sistemática. *Hoplias malabaricus*, *Erythrinus erythrinus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* devem, na realidade, corresponder a complexos de espécies, considerando as indicações já disponíveis sobre a biodiversidade cromossômica presente nestes grupos (Bertollo, 2007). De fato, *H. malabaricus*, *E. erythrinus* e *H. unitaeniatus* mostram uma ampla diversidade

cromossômica numérica e estrutural, podendo apresentar distintos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos e/ou simples entre diferentes “espécies” (**Tabela 1**) (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2011; Rosa et al., 2012).

A maioria das espécies da família Erythrinidae possui hábito sedentário, não superando grandes corredeiras e cachoeiras, de tal modo que esses obstáculos naturais podem influenciar a redução ou mesmo a interrupção do fluxo gênico entre populações de uma mesma bacia hidrográfica, dependendo da geomorfologia e topografia da região (Bertollo et al., 2000), facilitando assim sua diversificação. Em *H. malabaricus*, por exemplo, diversos cariomorfos (grupos de cariótipos diferenciados) já foram bem caracterizados, alguns dos quais são endêmicos de determinadas regiões enquanto que outros apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo também ocorrer em simpatria sem detecção de híbridos, reforçando assim um provável complexo de espécies (Bertollo et al., 2000).

Tabela 1: Dados cariotípicos da família Erythrinidae, (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2011). Os dados para *H. aimara* foram obtidos de Blanco et al., (2011).

Espécies / Número diplóides	Cariótipos	Cromossomos sexuais
<i>Erythrinus erythrinus</i>		
A 2n=54	♀♂ 46a + 2st + 6m	Não-diferenciados
B 2n=54/53	♀ 46a + 2st + 6m	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 44a + 2st + 7m	X ₁ X ₂ Y
C 2n=52/51	♀ 38a + 6st + 8m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 36a + 6st + 9m/sm	X ₁ X ₂ Y
D 2n=52/51	♀ 44a + 2st + 6m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 42a + 2st + 7m/sm	X ₁ X ₂ Y
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>		
A 2n=48	♀♂ 48m/sm	Não-diferenciados
B 2n=48	♀♂ 46m/sm + 2a	Não-diferenciados
C 2n=52	♀♂ 46m/sm + 6a	Não-diferenciados
D 2n=52	♀♂ 44m/sm + 2st + 4a	Não-diferenciados
<i>Hoplias malabaricus</i>		
A 2n=42	♀♂ 42m/sm	Não-diferenciados
B 2n=42	♀ 40m/sm + 2st	XX
	♂ 41m/sm + 1st	XY
C 2n=40	♀ 40m/sm	XX
	♂ 40m/sm	XY
D 2n=40/39	♀ 40m/sm	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂
	♂ 39m/sm	X ₁ X ₂ Y
E 2n=42	♀♂ 40m/sm + 2a	Não-diferenciados
F 2n=40	♀♂ 40m/sm	Não-diferenciados
G 2n=40/41	♀ 40m/sm	XX
	♂ 40m/sm	XY ₁ Y ₂
<i>Grupo Hoplias lacerdae</i>		
2n=50	♀♂ 50 m/sm	Não-diferenciados
<i>H. aimara</i>		
2n=50	♀♂ 50 m/sm	Não diferenciados

1.3. O gênero *Hoplias*

Entre as espécies do gênero *Hoplias*, a espécie *H. malabaricus* atualmente é a que apresenta maior número de populações citogeneticamente estudadas. Considerada como uma única entidade taxonômica, apresenta uma grande variabilidade onde sete cariomorfos (A, B, C, D, E, F e G) puderam ser claramente identificados, tendo em vista que possuem diferentes rearranjos cromossômicos já fixados (**Figura 1**). Os cariomorfos (A, E e F) não evidenciam diferenciação de cromossomos sexuais, enquanto que os cariomorfos (B e C) apresentam cromossomos sexuais do tipo simples (XX/XY) e os cariomorfos (G e E) sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. O cariomorfo D apresenta o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, enquanto que o cariomorfo G apresenta o sistema XX/XY_1Y_2 (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2009a; Cioffi et al., 2010; Cioffi et al., 2012).

O grupo *Hoplias lacerdae* foi definido como um conjunto de espécies que abrigam as traíras geralmente de grande porte, com as margens mediais dos dentários dispostas paralelamente e sem dentes no basi-hial, em oposição às traíras do grupo *Hoplias malabaricus*, cujas margens mediais dos dentários convergem em direção à sínfise mandibular e possuem dentes no basi-hial” (Oyakawa & Mattox, 2009).

Segundo estes autores, o número de espécimes do grupo *H. lacerdae* aumentou bastante em coleções ictiológicas nas últimas décadas, refletindo a expansão da distribuição geográfica desses animais em toda a América do Sul. Em revisão baseada em dados merísticos e morfométricos Oyakawa & Mattox (2009), identificaram cinco espécies nesse o grupo, ou seja, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. curupira*, estas duas últimas constituindo espécies novas. Enquanto que *H. lacerdae* encontra-se distribuída nos rios Ribeira de Iguape e Uruguai, *H. intermedius* ocorre nos rios São Francisco, alto Paraná e rio Doce, *H. brasiliensis* nos rios da costa Atlântica, *H. australis* no rio Uruguai e *H. curupira* nos rios Negro,

Trombetas, Tapajós, Xingu, Tocantins e Capim na bacia Amazônica, além de outros rios da Venezuela, Guiana e Suriname (Oyakawa & Mattox, 2009). De acordo com Britski (1972), *H. lacerdae* pode atingir até 26 kg, sendo que Gontijo (1984) considera esta espécie propícia para projetos de piscicultura uma vez que se desenvolve e desova naturalmente em cativeiro e apresenta alta taxa de ganho de peso.

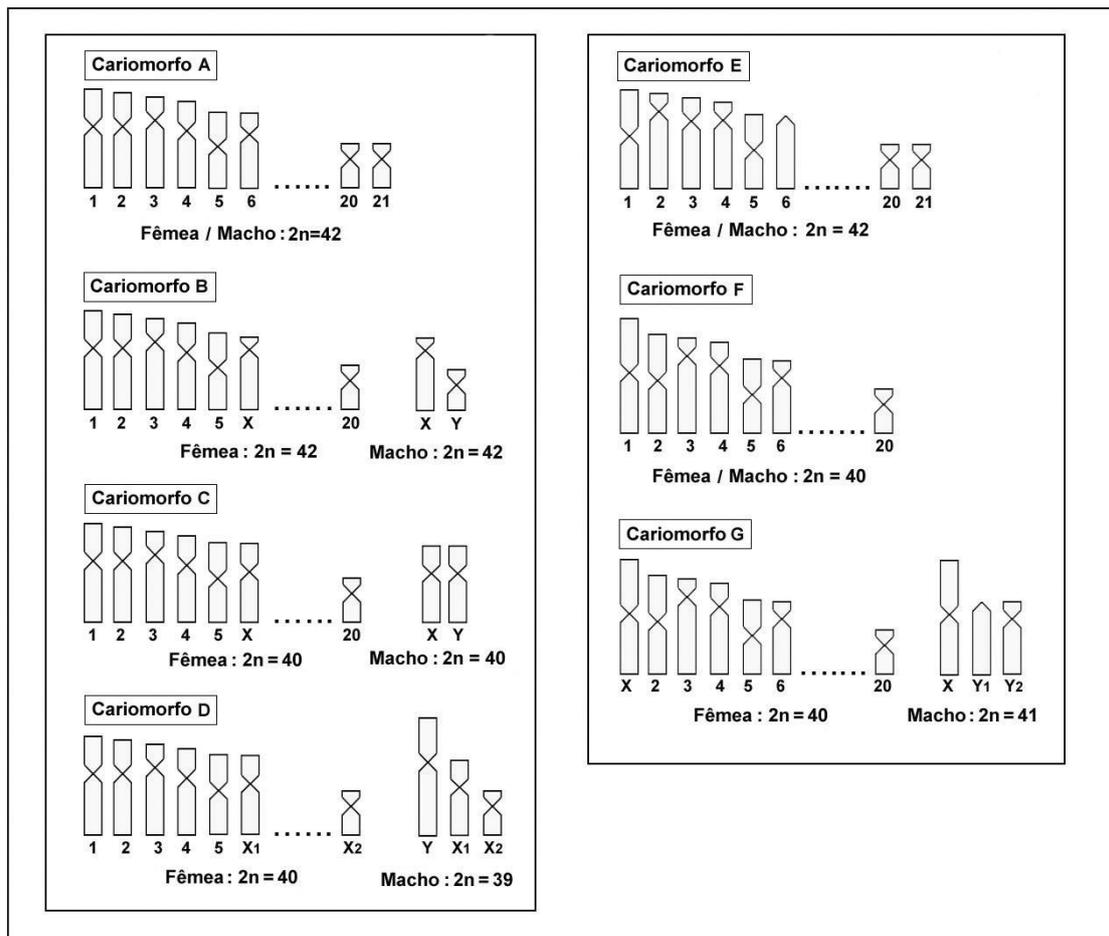


Figura 1. Ideograma representativo dos diferentes cariomorfos encontrados na espécie *Hoplias malabaricus*, com apresentação dos diferentes tipos de sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo, 2007; Cioffi, 2011; Cioffi et al., 2011).

Hoplias aimara é uma outra espécie que atinge grande porte, também comumente chamada de trairão, mas que não pertence ao grupo *H. lacerdae*. De acordo com Mattox et al. (2006), um estudo comparativo entre *H. aimara* e *H. macrophthalmus* resultou no reconhecimento de uma única espécie, ou seja, que *H. aimara* e *H. macrophthalmus* referem-se ao mesmo táxon e que, de acordo com o princípio da prioridade do código de nomenclatura zoológica, o nome *H. aimara* tem a precedência, encontrando-se distribuída em diferentes rios da bacia Amazônica.

Os estudos cromossômicos no grupo *H. lacerdae* são ainda bastante escassos, comparativamente aos dados já disponíveis para as espécies do grupo *Hoplias malabaricus*, *Erythrinus erythrinus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Este grupo tem evidenciado cariótipos conservados em relação ao número cromossômico e fórmula cariotípica, mantendo $2n=50$ cromossomos meta- e submetacêntricos, sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (Bertollo et al. 1978; Morelli et al. 2007; Blanco et al. 2011).

O estudo mais abrangente neste grupo é o de Morelli et al. (2007), onde foram analisados os cariótipos de espécimes de diferentes bacias hidrográficas e estações de piscicultura, tendo sido amostrados exemplares do rio São Francisco (MG), do rio Pitinga (AM), do rio Aripuanã (MT) e das estações de piscicultura da Universidade Federal de Uberlândia (MG), da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal, SP) e da Usina do Limoeiro (São José do Rio Pardo, SP). Em todos os casos o número diplóide foi $2n=50$ cromossomos meta-submetacêntricos, sem diferenciação de cromossomos sexuais. Em duas amostras (do rio São Francisco e da estação de piscicultura da Universidade Federal de Uberlândia), onde houve a possibilidade serem efetuadas análises citogenéticas mais pormenorizadas, foi identificado um único sítio de região organizadora de nucléolo (NOR) no par 11, utilizando-se concomitantemente a coloração pelo nitrato de Prata (Ag-NOR) e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

com sonda de DNAr 45S, o qual mostrou-se também rico em pares de bases GC, Mitramicina A₃-positivo. Adicionalmente, foram também evidenciados em quatro pares do cariótipo regiões centroméricas/pericentroméricas com afinidade pelo nitrato de Prata, as quais correspondem a segmentos de heterocromatina C-positiva argéntofílicas (**Figura 2**). A somatória das indicações obtidas neste estudo evidencia, embora preliminarmente, que a evolução cromossômica no grupo *Hoplias lacerdae* parece ser relativamente conservada, sem variações acentuadas na estrutura do cariótipo.

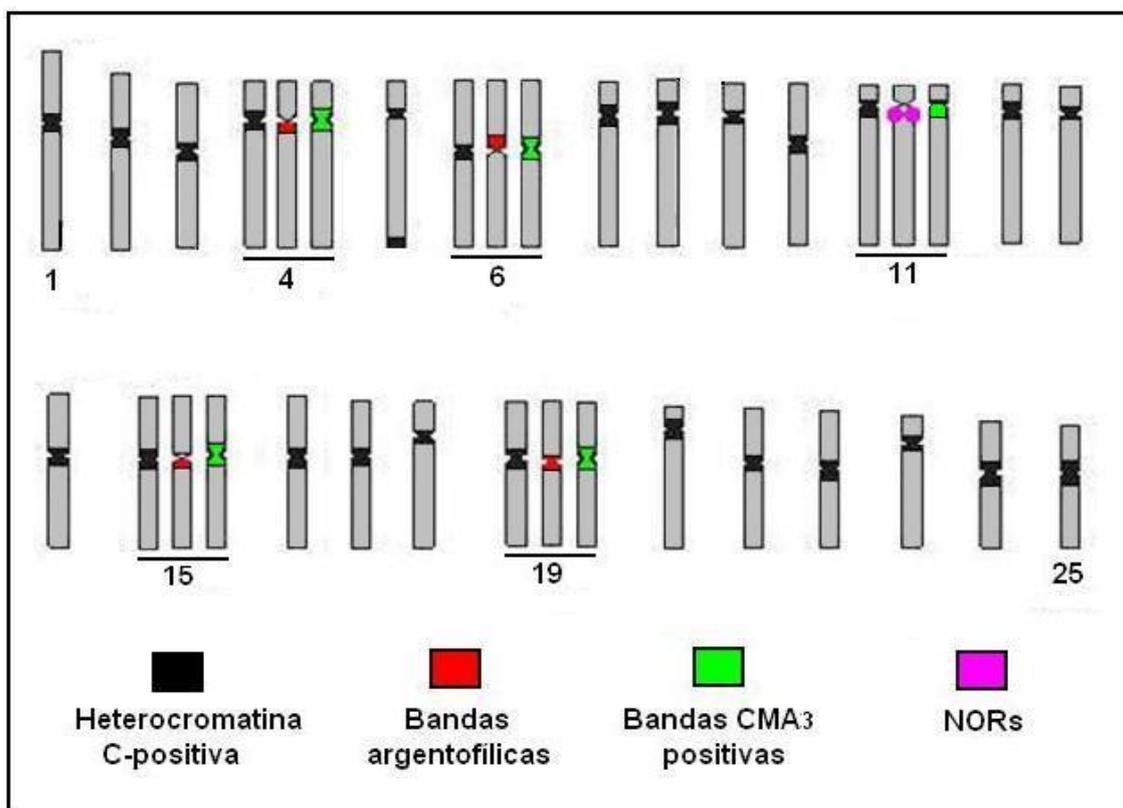


Figura 2. Ideograma representativo das características cariotípicas de representantes do grupo *Hoplias lacerdae*, evidenciando a localização da heterocromatina C-positiva, da NOR, assim como de bandas argéntofílicas e CMA₃ positivas nos cromossomos (modificado de Morelli et al., 2007).

Blanco et al., (2011) realizaram um estudo comparativo entre *H. intermedius* e *H. aimara*, ambas espécies denominadas popularmente de trairões. *H. intermedius*, na realidade, pode corresponder à mesma espécie estudada por Morelli et al. (2007), proveniente da bacia do São Francisco, uma vez que as características cromossômicas de *H. intermedius* são praticamente as mesmas evidenciadas por Morelli et al. (2007) no tocante ao número diplóide, tipos cromossômicos, distribuição da heterocromatina C-positiva e bandas CMA₃, além de um único sítio de NOR presente em um par de cromossomo idêntico. Entretanto, embora *H. aimara* apresente o mesmo número de cromossomos (2n=50) que *H. intermedius*, marcadores cromossômicos para DNAr 18S, regiões CMA₃ e DAPI evidenciaram diferenciações entre as duas espécies. Nenhum sinal de DNA Cot-1 de *H. aimara* foi detectado no genoma de *H. intermedius*, enquanto que, reciprocamente, quatro sítios de DNA Cot-1 de *H. intermedius* foram evidenciados nos cromossomos de *H. aimara*, evidenciando também diferentes composições de sequências repetitivas no genoma destas duas espécies (Blanco et al., 2011). Assim sendo, embora essas duas espécies compartilhem algumas características cromossômicas, elas apresentam particularidades genômicas próprias e pertencem a diferentes grupos taxonômicos da família Erythrinidae.

Os dados existentes no grupo *H. lacerdae* e na espécie *H. aimara* contrasta com o que ocorrem nos demais grupos de eritrínídeos. Entretanto, a única espécie do grupo *lacerdae* já estudada citogeneticamente e definitivamente reconhecida é *H. intermedius*, visto que todas as demais espécies já analisadas não possuem a sua real identidade estabelecida, sendo todas englobadas na denominação geral “grupo *H. lacerdae*”. Assim sendo, é necessário que uma abordagem cromossômica seja enfocada nas espécies recentemente reconhecidas do grupo *lacerdae*, conforme a revisão taxonômica de Oyakawa & Mattox (2009), para que se possa melhor esclarecer a história evolutiva deste grupo da nossa ictiofauna.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa e objetivo geral

A família Erythrinidae, embora relativamente pequena entre os Characiformes Neotropicais, se caracteriza por uma evolução cariotípica divergente entre seus diferentes gêneros (*Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*), apresentando diversidade cromossômica numérica, estrutural e de sistemas de determinação de sexo, que possibilitam reconhecer diferentes unidades evolutivas mesmo dentro de uma mesma espécie nominal (Bertollo, 2007; Cioffi et al., 2012). Particularmente contrastando com esta tendência encontra-se o grupo *H. lacerdae* e a espécie *H. aimara* aparentemente evidenciando uma homogeneidade cariotípica frente às poucas investigações disponíveis, mesmo em relação a espécies congênica do grupo *H. malabaricus*.

Assim sendo, o objetivo deste estudo é implementar a investigação cromossômica entre diferentes espécies do gênero *Hoplias*, buscando subsídios importantes para a constatação e compreensão dos seus processos evolutivos, testando a hipótese da evolução cromossômica conservativa e particularizada deste importante grupo da nossa ictiofauna.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Caracterizar a estrutura cariotípica geral (número diplóide, tipos cromossômicos e sua distribuição no cariótipo) de espécies *H. aimara*, *H. lacerdae*, *H. brasiliensis* e *H. intermedius*.

2.2.2. Analisar a distribuição da heterocromatina C-positiva e de bandas CMA₃ positivas nos cromossomos.

2.2.3. Mapear a distribuição dos sítios de DNAr 18S e DNAr 5S nos cromossomos.

2.2.4. Analisar a ocorrência e a distribuição de sítios de DNAs microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀ no genoma das espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragens do material biológico

Foram analisados representantes de *H. brasiliensis* coletados na Bacia do rio Jequitinhonha, *H. aimara* na Bacia Amazônica e espécimes de *H. intermedius* e *H. lacerdae* adquiridos em piscicultura.



Figura 3: Locais de origem das espécies de *Hoplias* analisadas no presente estudo. (1) *H. aimara*, (2) *H. brasiliensis*, (3) *H. intermedius* e (4) *H. lacerdae*. O círculo em preto representa a localização da estação de piscicultura no estado de Minas Gerais, fornecedora dos exemplares de *H. lacerdae* e *H. intermedius*. Figura modificada de (<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=27049>), acessado em 19 de abril de 2015.

H. intermedius



38cm

H. lacerdae



38cm

H. aimara



97cm

H. brasiliensis



28cm

Figura 4: Fotos das espécies de *Hoplias* analisadas no presente trabalho.

Indivíduos da espécie *Hoplias aimara*, foram coletados no “Córrego do Pastor”, pequeno riacho afluente do rio Xingu – bacia Amazônica, município de Querência – MT – Brasil, coordenadas: 12°59'55"S - 52°53'05"O, e foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – SP – Brasil, sob o número de depósito EAO2014080302.

Representantes da espécie *Hoplias brasiliensis* foram coletados no rio Itacambiruçú, bacia do rio Jequitinhonha, município de Cristália - MG - Brasil, coordenadas: 16°35'59,8"S - 42°49'51"O, e foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – SP – Brasil, com registro de depósito: EAO2014103101.

Os espécimes de *Hoplias intermedius* foram oriundos da represa da Usina Hidrelétrica de Furnas, localizada no rio Grande, bacia do rio Paraná, entre os municípios de São José da Barra e São João Batista da Glória – MG - Brasil, coordenadas: 20°40'11"S - 46°19'05"O e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – SP, sob o registro de depósito: EAO2014082801.

Os exemplares de *Hoplias lacerdae* foram procedentes do Vale do Ribeira, bacia do rio Ribeira de Iguape, SP, Brasil, coordenadas: 24°42'29"S - 47°33'19"O e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – SP, sob o registro de depósito: EAO2014082802.

Ambas as espécies *H. intermedius* e *H. lacerdae* foram obtidas por doação da Piscicultura “AQUAMINAS”, Rodovia MG-179, Km 60, entre os municípios de Poço Fundo e São João da Mata – MG, Brasil, coordenadas: 21°50'09"S - 49°55'46"O. As informações referentes à procedência dessas duas espécies foram fornecidas pelo proprietário da piscicultura AQUAMINAS.

Tabela 2: Espécies de *Hoplias* com seus locais de procedência, número de exemplares analisados e o registro de depósito no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - SP - Brasil.

Espécies	Procedência	Quantidade	Nº de Depósito
<i>Hoplias brasiliensis</i>	Grão Mogol (MG) – rio Itacambiruçú (bacia do rio Jequitinhonha)	08♂ 02♀	EAO2014103101
<i>Hoplias aimara</i>	Querência (MT) – bacia do rio Xingu	03♂ 01♀	EAO2014080302
<i>Hoplias intermedius</i>	Piscicultura Aquaminas - (bacia do rio Paraná).	04♂ 04♀	EAO2014082801
<i>Hoplias lacerdae</i>	Piscicultura Aquaminas - (bacia do rio Ribeira de Iguapé).	02♂ 06♀	EAO2014082802

Estados brasileiros: MT = Mato Grosso, MG = Minas Gerais.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos Bertollo et al., (1978; 1980) e Foresti et al., (1993)

Foram usados dois processos para obtenção dos cromossomos mitóticos, tratamento “in vivo” Bertollo et al., (1978; 1980) e tratamento “in vitro” Foresti et al., (1993), ambos com algumas modificações.

No tratamento “in vivo”, os animais foram previamente tratados com solução de colchicina a 0,025% na proporção de 1ml para cada 100 gramas de peso do animal, por intermédio de injeção intra-abdominal e mantidos em aquário aerado durante 40-50 minutos. A seguir foram anestesiados com solução de benzocaína (1g/1000ml), sacrificados e extraídos fragmentos do seu rim anterior. Os fragmentos foram transferidos para um pequeno recipiente contendo 10 ml de solução hipotônica de cloreto de Potássio (KCl) a 0.075M e com o auxílio de uma seringa sem agulha esta solução foi fragmentada com leves movimentos de aspiração e expiração até se obter uma suspensão celular homogênea, depois foi mantida durante 30 a 40 minutos em estufa a 36 °C. A seguir a suspensão celular foi pré-fixada com seis gotas de fixador, uma mistura de álcool metílico (3 partes) e ácido acético glacial (1 parte), depois foi centrifugada a (1000 rpm) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 ml de solução de fixação e centrifugadas por mais duas vezes. Lâminas contendo preparações metafásicas foram obtidas conforme o procedimento usualmente utilizado para a metodologia de “air drying”.

Na técnica de tratamento “in vitro”, os animais foram também anestesiados com solução de benzocaína (1g/1000ml), e sacrificados. Porções do rim anterior foram retirados e colocados em uma pequena cubeta contendo 10ml de meio de cultura (RPMI 1640). As células renais foram dissociadas com uma seringa sem agulha, por de movimentos leves de aspiração e expiração dos tecidos, até se obter uma solução celular

homogênea. Duas a três gotas de solução de colchicina 0,025% foram pingadas na suspensão celular, com o auxílio de uma pipeta de vidro. A suspensão foi homogeneizada e mantida na estufa a 36° por 30 minutos, e depois centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. Em seguida foi ressuspensa em 10 ml de solução de cloreto de Potássio (KCl 0.075M) e mantida na estufa a 36° por 30 minutos, sendo posteriormente pré-fixada com seis gotas de fixador (mistura de 3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético glacial). A suspensão foi novamente centrifugada a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 10 ml do fixador metanol/ácido acético e novamente centrifugada. Este último passo foi repetido por mais duas vezes. Lâminas contendo preparações metafásicas foram obtidas conforme o procedimento usualmente utilizado para a metodologia de “air drying”.

3.2.2. Estimulação mitótica - Cavallini & Bertollo (1998)

A fim de aumentar a quantidade de células em divisão mitótica os animais foram injetados intraperitonealmente com 1 ml de suspensão de levedura (12g de fermento biológico + 12g de sacarose) para cada 100g de peso do animal por um período de 24h à 72h.

3.2.3. Detecção da heterocromatina C-positiva pelo bandamento C - (Sumner, 1972; Lui et al., 2011)

As preparações cromossômicas foram submetidas à solução diluída de ácido clorídrico (HCl 0,2N) a temperatura ambiente, por 12 minutos, lavadas em água destilada e secadas ao ar. A seguir, o material foi incubado em solução de hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2$ a 5%, a 42°C, durante aproximadamente 1 minuto e 10 segundos para *H. lacerdae*, *H. intermedius* e *H. brasiliensis* e 1 minuto e 45 segundos para *Hoplais aimara*. A seguir, as lâminas foram lavadas rapidamente em solução de HCl 0,2N e

depois em água destilada. Após a secagem ao ar, as preparações foram tratadas com solução salina 2xSSC durante 45 minutos em estufa a 60 °C, lavadas em água destilada e novamente secadas ao ar. Os cromossomos foram corados com 20 µl de solução “antifading” e iodeto de Propídeo 50mg/ml (Lui et al., 2011). O material foi coberto com uma lamínula e mantido no escuro por uma hora. Alternativamente, foi também utilizada a coloração convencional com Giemsa a 2%. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm com objetiva de 100 vezes ou no microscópio óptico em aumento de 1000 vezes.

3.2.4. Detecção de bandas cromossômicas GC-ricas (Schmid, 1980).

Os cromossomos foram corados com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃), utilizando como contra corante a Distamicina A, seguindo-se basicamente o protocolo descrito por Schmid (1980), com algumas modificações. Foram adicionados 80µl de solução de Cromomicina A₃ sobre cada lâmina, cobrindo com uma lamínula e permanecendo por 1 hora no escuro. Após a lavagem em água corrente e secagem ao ar, foram adicionados cerca de 80µl de solução de Distamicina sobre cada lâmina, cobrindo-se novamente com uma lamínula e permanecendo por 15 minutos no escuro. Após lavagem em água corrente e secagem rápida ao ar, foram adicionados cerca de 15µL de solução de DAPI/ “antifading” sobre cada lâmina, as quais foram estocadas em geladeira por no mínimo uma semana para a estabilização do fluorocromo. A análise do material foi realizada em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm, com objetiva de 100 vezes.

3.2.5. Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) pelo nitrato de Prata (Ag-NORs) (Howell & Black, 1980)

Foi utilizado o procedimento descrito por Howell & Black (1980) com algumas modificações. Os cromossomos foram tratados com uma mistura 1:2 de 0,5g de nitrato de prata (AgNO_3) dissolvida em 2 ml de água destilada + gelatina comum. Foram adicionadas nove gotas desta mistura sobre as lâminas, mantendo-as em estufa a 60°C por 9 a 10 minutos. Posteriormente, o material foi lavado, secado ao ar e analisado em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes.

3.2.6. Híbridação *In Situ* Fluorescente (FISH)

3.2.6.1. Sondas

Foram utilizadas as seguintes sondas de seq ncias de DNAs repetitivos para mapeamento citogenético e obtenção de possíveis marcadores específicos nos cromossomos das espécies em estudo:

- a) DNAr 5S: incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS), isoladas diretamente do genoma de *Hoplias malabaricus* (Martins et al., 2006).
- b) DNAr 18S: segmento de 1.400 pares de bases do gene de RNAr 18S obtido por PCR a partir do DNA nuclear de *Hoplias malabaricus* (Cioffi et al., 2009).
- c) Oligonucleotídeos enriquecidos com seq ncias microssatélites: d(GA)_{15} , d(CA)_{15} , d(CAA)_{10} , marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, segundo Kubat et al., (2008), com pequenas modificações.

3.2.6.2. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas com biotina-14-dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) ou com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do manual do fabricante. O produto destas reações

foi precipitado com acetato de Potássio e etanol durante 16h à -20°C . Posteriormente, os materiais foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm, descartando os sobrenadantes e os DNAs marcados secados completamente em estufa a 37°C .

3.2.6.3. Preparação das lâminas, hibridização e detecção do sinal (Pinkel et al., 1986)

As lâminas com as preparações cromossômicas foram inicialmente colocadas em uma estufa a 37°C por 50 minutos, depois incubadas com 70 μl de RNase (1 μl RNase 10mg/mL + 1mL 2xSSC) por 1h à 37°C em câmara úmida. Após este período foram lavadas durante 5 minutos em uma solução de 1xPBS e secadas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50 μl de Pepsina 0.005% em cada lâmina e encubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período as lâminas foram lavadas durante 5 minutos em solução 1xPBS em temperatura ambiente e fixadas com formaldeído 1% por 10 minutos, também em temperatura ambiente. Posteriormente o material foi desnaturado em uma solução contendo formamida/2xSSC por 3 minutos e 15 segundos à 72°C . Em seguida procedeu-se a desidratação em etanol 70% à -20°C por 2 minutos e depois em etanol 90% e 100%, 2 minutos cada banho em temperatura ambiente. Em paralelo, a mistura de hibridização, contendo 100ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2xSSC e 50% de formamida, em um volume final de 30 μl , foi aquecida a 100°C , por 10 minutos, e então aplicada sobre as lâminas e a hibridização realizada por um período de 16-18h, a 37°C , em câmara úmida. No caso de experimentos de dupla-FISH, sondas biotiniladas e marcadas com digoxigenina foram adicionadas concomitantemente no mix de hibridização, em uma proporção de 1:1. As lavagens pós-hibridização foram realizadas durante 5 minutos em 2xSSC a 37°C e 5 minutos em 1xSSC, em temperatura ambiente. A detecção das sondas foi realizada com avidina-FITC 0,07% conjugados (Sigma), em tampão C (0.1 M

NaHCO₃, 0,15 M NaCl), por 1h, para sondas previamente marcadas com biotina, ou com anti-digoxigenina-rodamina (Roche), em tampão C (0.1 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl), também por 1h, para sondas previamente marcadas com digoxigenina. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (1,2 µg/ml) e as lâminas montadas em solução “antifading”.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram analisadas aproximadamente 30 metáfases por espécie. As preparações foram analisadas em microscópios ópticos e de epifluorescência, com os filtros apropriados, sendo as imagens capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro (Media Cybernetic). Foi mantida uma padronização quanto à apresentação do cariótipo das diferentes espécies, para possibilitar uma análise comparativa mais apropriada entre as mesmas. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm) considerando as relações de braços proposta por Levan et al., (1964). Os dados obtidos foram empregados para uma abordagem comparativa entre as diferentes espécies analisadas, juntamente com dados já existentes na literatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo e a sua discussão encontram-se organizados na forma de um artigo científico, o qual se encontra submetido para publicação no periódico *Molecular Cytogenetics*.

Capítulo 1

Modelos evolutivos contrastantes entre espécies congenéricas. Uma investigação cromossômica no gênero *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae)

Ezequiel Aguiar de Oliveira, Luiz Antônio Carlos Bertollo, Cassia Fernanda Yano, Thomas Liehr, Marcelo de Bello Cioffi

Molecular Cytogenetics (Submetido)

Resumo

Erythrinidae é uma pequena família de peixes, com apenas três gêneros, *Hoplias*, *Erythrinus* e *Hoplerythrinus*, amplamente distribuídos na região Neotropical. Esta família é caracterizada por uma notável diversidade cromossômica, tanto numérica como estrutural, com números diploides variando de $2n = 39$ a $2n = 54$ cromossomos e incluindo a ocorrência de sistemas de cromossomas sexuais simples e múltiplos em algumas espécies. No entanto, excluindo *Hoplias malabaricus*, pouca informação citogenética está disponível para outras espécies do gênero *Hoplias*. Aqui nós investigamos as características cromossômicas de 04 espécies pertencentes ao gênero *Hoplias* - *H. lacerdae*, *H. brasiliensis*, *H. intermedius* e *H. aimara* - utilizando diferentes procedimentos de análises, como o bandamento C, coloração pelo nitrato de Prata (AgNORs) e CMA₃, bem como experimentos de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), utilizando sequencias de DNAs microssatélites e ribossomais como sondas. O objetivo foi analisar diferentes modelos de evolução cariotípica dentro deste gênero. O mapeamento citogenético das diferentes classes de DNAs repetitivos revelou algumas diferenças interespecíficas particulares entre as espécies analisadas. No entanto, todas as espécies apresentaram uma grande homogeneidade na sua macroestrutura cariotípica, com $2n = 50$ cromossomos meta- submetacêntricos, a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos, padrão semelhante de heterocromatina C-positiva e um único par cromossômico idêntico, portador de AgNOR. Portanto, os mecanismos evolutivos não foram seguidos por grandes mudanças em seus cariótipos. Entretanto, tal conservadorismo cariotípico contrasta com a enorme diversidade cromossômica geralmente observada em outras espécies de Erythrinidae, particularmente na espécie congenérica, *H. malabaricus*. Mas, o que impulsiona a ocorrência de modos distintos de evolução cariotípica entre espécies estreitamente relacionadas? Diferenças nos modos de vida, na estrutura populacional e em características moleculares intrínsecas são fatores que podem estar provavelmente envolvidos em tais ocorrências.

Introdução

A família Erythrinidae é um pequeno grupo de peixes de água doce composta por três gêneros, *Hoplias* (Gill, 1903), *Erythrinus* (Scopoli, 1777) e *Hoplerythrinus* (Gill 1895) (Oyakawa, 2003). Os eritrinídeos são caracterizados por uma notável variedade cromossômica, tanto numérica como estrutural, com cariótipos variando de $2n = 39$ a $2n = 54$ cromossomos e incluindo a ocorrência de sistemas de cromossomas sexuais simples e múltiplos em algumas espécies. Assim, eles representam um modelo interessante para investigar o processo de evolução cromossômica entre peixes Neotropicais (Bertollo et al., 2007; Cioffi et al., 2013).

Entretanto, embora pequena, esta família ainda apresenta alguns problemas taxonômicos não resolvidos. Especificamente no gênero *Hoplias*, três grandes grupos de espécies foram definidos com base em seus caracteres morfológicos: *H. lacerdae*, *H. malabaricus* e *H. macrophthalmus* (Oyakawa, 1990). O grupo *lacerdae* foi recentemente revisto e 5 espécies válidas são agora reconhecidas: *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. curupira* e *H. australis*, sendo os dois últimos correspondentes à novas espécies (Oyakawa & Mattox, 2009). O grupo *macrophthalmus* também foi revisto e apenas uma única espécie é agora considerada, dado que as espécies nominais, *H. aimara* e *H. macrophthalmus*, anteriormente consideradas, se referem a um mesmo táxon, onde o nome *H. aimara* tem precedência de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Mattox et al., 2006). Por sua vez, o grupo *malabaricus*, constituindo um provável complexo de espécies, ainda requer revisão taxonômica.

De fato, os dados citogenéticos obtidos até o presente momento sugerem que as três espécies nominais, *Erythrinus erythrinus*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Hoplias malabaricus*, constituem um conjunto de espécies (Bertollo, 2007). Notavelmente, *H.*

malabaricus apresenta uma grande variação cariotípica, com 7 cariomorfos distinguíveis pelo número diploide, forma e tamanho dos cromossomos e sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo et al., 2000; Bertollo, 2007). Além disso, diferentes classes de DNAs repetitivos também forneceram dados relevantes sobre a diversificação populacional destes peixes, representando bons marcadores cromossômicos para detectar eventos evolutivos recentes (Cioffi et al., 2012).

Excluindo *H. malabaricus*, pouca informação citogenética está disponível para outras espécies do gênero *Hoplias*, algumas delas com destaque especial quanto ao tamanho que apresentam, uma vez que podem atingir ou mesmo exceder 1,0 metro de comprimento. Os poucos dados citogenéticos disponíveis apontam para a presença de uma mesma fórmula cariotípica geral, com um número invariável de 50 cromossomos e a ausência de cromossomos sexuais diferenciados (Bertollo et al., 1978; Blanco et al., 2011). Assim, tais características aparentemente contrastam com a enorme diversidade cariotípica que tem sido geralmente observada em outras espécies da família Erythrinidae e, particularmente, entre os espécimes representativos do grupo *H. malabaricus*.

Assim sendo, este estudo foi realizado com o intuito de explorar modelos existentes de evolução cariotípica entre espécies congênicas do gênero *Hoplias*, empregando métodos de citogenética clássica e molecular, tendo como base espécies já bem definidas considerando suas revisões taxonômicas recentes. Objetivou-se (1) o conhecimento da estrutura cariotípica de espécies de *Hoplias* até então não analisadas, (2) investigar a divergência cromossômica e prováveis relações entre as diferentes espécies e (3) explorar / discutir os caminhos evolutivos contrastantes dentro deste gênero.

Material e Métodos

Material

Preparações cromossômicas foram obtidas a partir de 04 espécies distintas pertencentes ao gênero *Hoplias*, conforme especificado na **Tabela 3**. As amostras foram coletadas com a autorização do órgão ambiental brasileiro ICMBIO/SISBIO (Licença nº 48.628-2). Todas as espécies foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Oswaldo T. Oyakawa, taxonomista especialista deste grupo zoológico, sendo depositadas no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) (**Tabela 3**).

Preparações cromossômicas mitóticas

Os animais foram injetados na região abdominal com uma solução aquosa de colchicina a 0,025%, na proporção de 1ml/100 g de peso. Depois de 40-50 minutos, os espécimes foram sacrificados, e as preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do rim anterior (Bertollo et al., 1978). Os procedimentos foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo nº CEUA1853260315).

Coloração cromossômica

Em adição a coloração Giemsa convencional, os cromossomos foram também analisados após coloração com nitrato de Prata (Howell & Black, 1980), a fim de visualizar as Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RONs). A técnica de bandamento C também foi utilizada para detectar a distribuição da heterocromatina C-positiva nos cromossomos (Sumner, 1972). A coloração com Cromomicina A3 (CMA₃) foi também utilizada para identificar as regiões ricas em GC nos cromossomos (Sola et al., 1992).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Foram utilizadas duas sequências de DNAr isoladas a partir do genoma de *Hoplias malabaricus*. A primeira sonda incluiu cópias repetidas de DNAr 5S, contendo 120 pares de bases (pb) do gene codificante (DNAr 5S) e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS) (Martins et al., 2006). Já a segunda sonda correspondeu a um segmento de 1.400 pares de bases do gene do RNAr 18S, obtido por PCR a partir do DNA nuclear de *H. malabaricus* (Cioffi et al. 2009a). A sonda de DNAr 18S foi marcada com biotina-14-dATP utilizando o kit de marcação Biotin-Nick Translation Mix (Roche), enquanto que a sonda de DNAr 5S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, também foram utilizadas sondas de oligonucleótidos, contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀, marcadas diretamente com Cy3 durante a síntese pela Sigma (St. Louis, MO, EUA) (Kubat et al., 2008).

Preparação das lâminas, hibridação e detecção do sinal

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada sob altas condições de extringência nos cromossomos mitóticos (Pinkel et al., 1986). Os cromossomos metafásicos foram incubados com RNase (40 µg/ml) por 1 hora à 37°C. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%, 2 × SSC à 70°C, as preparações foram incubadas em 2 x SSC por 4 min à 70 °C. A mistura de hibridização (100 ng da sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2 × SSC e formamida 50% em um volume final de 30 µL) foi aplicada sobre as lâminas e a hibridização foi realizada durante uma noite à 37 °C, em uma câmara úmida contendo 2 x SSC. Duas lavagens pós-hibridização foram realizadas em um agitador (150 rpm) à 37 °C, a primeira em formamida 50%, 2 × SSC por 15 min, e a segunda em 2 × SSC por 15 min.

A lavagem final foi realizada em $4 \times \text{SSC}$ a temperatura ambiente, por 15 min. Estreptavidina-Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada para a detecção do sinal da sonda de DNAr 18S, enquanto anti-digoxigenina FITC (Roche, Mannheim, Alemanha) foi usada para detectar as sondas de DNAr 5S. Os cromossomos foram corados com DAPI (1,2 $\mu\text{g/ml}$) em solução de “antifading” (Vector, Burlingame, CA, EUA).

Análises de microscopia

Aproximadamente 30 metáfases foram analisadas por espécie para confirmar o número de cromossomos, a estrutura do cariótipo e os resultados de FISH. As imagens foram capturadas em microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) usando o software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) ou submetacêntricos (sm) de acordo com suas relações de braço (Levan et al., 1964).

Resultados

Indivíduos de todas as espécies estudadas apresentaram $2n = 50$ cromossomos, em ambos os sexos. Apenas pequenas variações em suas fórmulas cariotípicas foram detectáveis, sendo 20 cromossomos metacêntricos (m) e 30 submetacêntricos (sm) em *H. intermedius*, *H. brasiliensis* e *H. aimara*, e 16m e 34sm em *H. lacerdae*. Além disso, 1-2 cromossomos supranumerários foram encontrados em alguns indivíduos de *H. aimara* (**Figuras 5 e 6**). A heterocromatina C-positiva foi observada na região centromérica de todos os cromossomos e na região terminal de alguns pares de cromossomos em todas as espécies analisadas (**Figuras 5 e 6**).

Quando corados com CMA₃/DAPI, variações significativas foram observadas nas diferentes espécies. Enquanto *H. intermedius* e *H. brasiliensis* apresentaram 8 sítios

CMA₃⁺ localizados nas regiões centroméricas de quatro pares de cromossomos, *H. aimara* mostrou apenas 2 sítios em um par submetacêntrico, também presente nas duas espécies acima referidas (**Figuras 5 e 6**). Por sua vez, *H. lacerdae*, não apresentou qualquer sítio CMA₃⁺ em seus cromossomos (**Figura 5**).

O mapeamento cromossômico utilizando DNAs microssatélites (GA)₁₅ e (CA)₁₅ mostrou padrões semelhantes em todas as espécies, com sinais espalhados por toda a extensão dos cromossomos, além de um acúmulo notável na região subteloamérica. No entanto, foram observados padrões diferentes entre as espécies com o microssatélite (CAA)₁₀. Além da presença de sinais dispersos ao longo do comprimento de todos os cromossomos, um acúmulo considerável desta sequência foi detectado em um par de específico de cromossomos, não homólogo entre as espécies, com exceção de *H. lacerdae* onde tal acúmulo não foi constatado (**Figuras 7-10**).

Sítios de DNAr 5S foram encontrados em apenas um par cromossômico por espécie, sendo este idêntico nas 04 espécies analisadas. No entanto, o DNAr 18S mostrou distribuições específicas para cada espécie, mostrando ser um bom marcador citotaxonômico. Todas as espécies compartilharam um par cromossômico submetacêntrico característico portador destes sítios, também corado pelo nitrato de Prata, representando o único sítio Ag-RON ativo nestas espécies. Além disso, *H. brasiliensis*, *H. aimara* e *H. lacerdae* apresentaram 4, 2 e 1 sítios adicionais de DNAr 18S, respectivamente, alguns deles homólogos entre as espécies (**Figuras 7-10**).

Para uma melhor visualização e comparação entre as espécies, a **Figura 11** resume os resultados de citogenética clássica e molecular acima mencionados.

Discussão

Considerações sobre a evolução cromossômica no gênero *Hoplias*

Excluindo algumas características de pouco destaque, tais como um número ligeiramente diferente de cromossomos meta- e submetacêntrico em *H. lacerdae* e a ocorrência de alguns microcromossomos supranumerários em *H. aimara*, todas as quatro espécies analisadas mostraram uma grande homogeneidade na sua macroestrutura cariotípica, com cariótipos compostos por 50 cromossomos meta e submetacêntricos. Além disso, observou-se um padrão semelhante de distribuição da heterocromatina C-positiva, das Ag-NORs, assim como a não ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos detectáveis. Portanto, a especiação neste grupo de espécies de *Hoplias* não foi acompanhada por mudanças significativas a nível cromossômico. Tal cenário conservador também foi encontrado em alguns resultados anteriores, onde diferentes populações de *H. aimara* e *H. intermedius*, e um grupo de espécimes não identificadas do chamado "grupo lacerdae", compartilharam a mesma macroestrutura cariotípica (Morelli et al., 2007; Blanco et al., 2011). Desta forma, este modelo particular da evolução cromossômica é agora caracterizado e compartilhado por um grupo de espécies bem reconhecidas dentro do gênero *Hoplias*.

No entanto, apesar de mecanismos evolutivos terem evitado grandes mudanças nos cariótipos destas espécies de *Hoplias*, o mapeamento citogenético de diferentes sequências de DNAs repetitivos forneceram marcadores cromossômicos confiáveis, revelando diferenças específicas entre elas, como também previamente observado para outras populações distintas de *H. aimara* e *H. intermedius* (Blanco et al., 2011). Na verdade, DNAs repetitivos são altamente dinâmicos ao longo da evolução, permitindo sua aplicação em estudos evolutivos (Biemont & Vieira, 2006). Embora o DNAr 5S mostrou uma distribuição conservada nos cromossomos de todas as espécies analisadas, como é geralmente observado na maioria das famílias de peixes (Gornung et al., 2013),

a distribuição do DNAr 18S e sítios CMA₃⁺ apresentaram diferenças significativas. Com a exceção de *H. lacerdae*, todas as espécies compartilharam um par cromossômico submetacêntrico característico que possui um sítio de DNAr 18S/CMA₃⁺ (**Figuras 5-11**). Na verdade, RONS ricas em GC são comumente encontrados entre os peixes (Mayr et al., 1985; Bellafronte et al., 2009), e estes foram também os únicos sítios Ag-RONS ativos. No entanto, nem todos os sítios de DNAr 18S foram necessariamente GC-ricos, situação também já encontrada em outras espécies de peixes (Mandrioli et al., 2001; Souza et al., 2001).

Sítios adicionais de DNAr 18S foram encontrados em *H. brasiliensis*, *H. aimara* e *H. lacerdae*, cada espécie apresentando um padrão particular de 6, 4 e 3 sítios, respectivamente. Uma condição polimórfica, onde apenas um cromossomo do par homólogo apresentou um sítio de DNAr 18S, foi observada em *H. brasiliensis* e *H. lacerdae* (**Figura 11**). Esta situação pode dever-se a i) uma limitação da técnica de FISH para detectar as sequências de DNAr em ambos os cromossomos, devido à seu reduzido número de cópias; ii) a ocorrência de *crossing-over* desiguais, alterando a quantidade de DNAr entre os homólogos, ou iii) a mobilidade de sequências de DNAr pela atividade dos elementos transponíveis (TEs). Na verdade, os genomas dos peixes contêm muitos tipos de TEs e uma série de estudos recentes vem demonstrando o seu potencial na mobilidade do DNAr (Raskina et al., 2008; Volff, 2005; Costa et al., 2013). Particularmente, em outra espécie de eritrínídeo (*Erythrinus erythrinus*), a inserção do elemento transponível *Rex3* em sequências de DNAr é tida como responsável pelo espalhamento do DNAr no genoma desta espécie (Cioffi et al., 2010; Martins et al., 2013).

Os microssatélites são sequências repetidas abundantes presentes em todos os genomas dos eucariotos estudados até o presente momento (Tautz & Renz, 1984). Nos peixes, os microssatélites são geralmente localizados nas regiões centroméricas e

teloméricas dos cromossomos, onde uma fração significativa de DNAs repetitivos é encontrada (Cioffi & Bertollo, 2012). Os microssatélites (CA)₁₅e (GA)₁₅ mostraram uma distribuição semelhante nas quatro espécies analisadas, sendo abundantemente localizadas nas regiões teloméricas de todos os cromossomos, como também observado em algumas outras espécies de peixes, como *Triportheus trifurcatus*, *Imparfinis schubarti*, *Danio rerio* e em *H. malabaricus* (Vanzela et al., 2002; Yano et al., 2014). Em contraste, o microssatélite (CAA)₁₀ mostrou uma distribuição específica para *H. intermedius*, *H. brasiliensis* e *H. aimara*. Além da sua distribuição ao longo dos cromossomos, um forte acúmulo foi encontrado em um determinado par cromossômico para cada espécie, com exceção de *H. lacerdae*, apontando para ocorrência de caminhos evolutivos distintos na organização genômica entre essas espécies de *Hoplias*.

De fato, os DNAs repetitivos são caracterizados por um processo evolutivo dinâmico (Wichman et al., 1991; López-Flores et al., 2012) e uma das principais propriedades de sequências microssatélites é a capacidade de originar variações com números diferentes de repetições (Bhargava & Fuentes, 2010). Deste modo, a fração repetitiva do genoma (aqui exemplificada pelo DNAr e microssatélites) parece escapar da pressão seletiva que atua nos segmentos não-repetitivos, sendo assim capaz de mostrar eventos evolutivos recentes (Martins, 2007). Portanto, embora preservando uma macroestrutura cariotípica semelhante, é evidente que as distintas espécies de *Hoplias* apresentam algumas diferenciações cromossômicas internas, provavelmente devido ao fluxo gênico restrito, corroborando com a sua recente revisão taxonômica.

Entretanto, a característica mais intrigante surge quando analisamos o cenário existente na espécie congênica *H. malabaricus* (**Figura 12**). Diferentemente do padrão conservado de cariótipos com $2n = 50$ e cromossomos meta-submetacêntricos em ambos os sexos nas espécies ora analisadas, *H. malabaricus* apresenta uma diferenciação acentuada entre as populações distribuídas por toda a região Neotropical,

permitindo a caracterização de vários cariomorfos que divergem no número diplóide, na morfologia cromossômica, na distribuição de sequências repetitivas de DNA e na presença de sistemas de cromossomos sexuais simples ou múltiplos (Bertollo et al., 2000; Cioffi et al., 2012; Cioffi et al., 2009^a). Embora alguns desses cariomorfos sejam endêmicos a uma determinada bacia hidrográfica, outros possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados também em simpatria sem a detecção de híbridos, o que indica a ocorrência de um provável complexo de espécies (Bertollo et al., 2000). Adicionalmente, análises moleculares também destacam a divergência evolutiva em *H. malabaricus*, suportando a hipótese de que mesmo um único cariomorfo pode conter mais do que uma única espécie (Marques et al., 2013). Concordantemente, a diferenciação entre as populações de um mesmo cariomorfo também foi evidenciada pela distribuição de DNAs repetitivos nos cromossomos, reforçando assim a biodiversidade presente neste grupo (Cioffi et al., 2009b).

Portanto, um conservadorismo cromossômico, juntamente com a presença de cariótipos altamente variáveis, está presente em diferentes espécies de *Hoplias*, evidenciando relações evolutivas altamente distintas entre espécies congênicas.

O que leva a modos distintos de evolução cariotípica entre espécies estreitamente relacionadas?

Processos de diversificação cariotípica e padrões morfológicos são muitas vezes indicadores do estilo de vida de uma espécie (Wainwright & Reilly, 1994), e vários vertebrados oferecem uma oportunidade única para analisar tais correlações, uma vez que algumas espécies experimentaram taxas mais rápidas de mudanças evolutivas na anatomia e no seu modo de vida do que outras (Rabosky et al., 2013).

Nos mamíferos, por exemplo, alguns táxons apresentam uma maior taxa de evolução cromossômica e isso pode ser explicado pela forma como as espécies estão

socialmente organizadas (Wilson et al., 1975). Tem sido sugerido que os sistemas sociais presentes em alguns grupos de mamíferos levam a uma estrutura populacional que favorecem à ocorrência de endogamia e favorece a deriva genética, facilitando a fixação de rearranjos cromossômicos (Bush et al., 1977). O fator-chave envolvido parece ser o tipo de comportamento social, gerando tamanhos efetivos pequenos de população e endogamia.

Um bom exemplo sobre as diferenças na variabilidade cromossômica em espécies estreitamente relacionadas pode ser também observado entre cães e raposas. Neste caso, todos os membros do gênero *Canis* apresentam $2n = 78$ cromossomos, ao passo que em raposas o número cromossômico varia de 38 a 78 (Bush, 1975). Essa diferenciação pode ser devido a seus diferentes comportamentos sociais. Enquanto os cães apresentam uma distribuição geográfica mais ampla e cruzam livremente, as raposas vivem em grupos familiares menores e não ocupam um território tão vasto e, portanto, novos rearranjos cromossômicos são mais propensos a persistir entre raposas devido à endogamia (Gibson, 1984). Outro cenário interessante é encontrado na ordem Perissodactyla, compreendendo as famílias Equidae, Tapiridae e Rhinocerotidae (Radinsky, 1966; Trifonov et al., 2008). As taxas de rearranjos são até 200 vezes maiores em equídeos, em comparação com os outros membros existentes, onde o número diplóide varia de $2n = 32$ em *Equus zebra* a $2n = 66$ em *E. ferus przewalskii* (Ryder et al., 1978). Esta rápida taxa de evolução cromossômica parece ser concomitante com eventos de especiação e dispersão do gênero *Equus* que ocorreram na África no final do Plioceno e início do Pleistoceno (Bernor et al., 2010).

Curiosamente, em espécie do gênero *Hoplias*, duas situações distintas podem ser observadas em relação a seus hábitos ecológicos. Enquanto *H. malabaricus* é caracterizada por ter um hábito mais sedentário, ocupando preferencialmente lagoas marginais, *H. lacerdae*, *H. aimara*, *H. brasiliensis* e *H. intermedius* tem hábito

diferente, ocupando preferencialmente a calha principal dos rios (Blanco et al., 2011). Portanto, populações menores e mais isoladas podem ser comumente encontradas em *H. malabaricus*, permitindo a fixação de rearranjos cromossômicos e a geração de uma diversidade cariotípica tanto intra- como interespecífica, ao contrário de outras espécies de *Hoplias*. A coexistência destes distintos estilos de vida e estrutura populacional pode, portanto, estar correlacionados com os dois modelos evolutivos contrastantes presentes neste gênero e, conseqüentemente, na ocorrência da diversidade cromossômica altamente diferenciada entre espécies congênicas.

Na realidade, rearranjos cromossômicos podem espalhar-se e serem fixados mais facilmente em pequenas populações, devido a maior probabilidade de geração de formas homozigóticas para os rearranjos, as quais estão livres dos problemas de segregação meiótica (Pellestor et al., 2011). O fato de que muitas espécies diferirem quanto a presença e fixação de rearranjos cromossômicos específicos sugere que os rearranjos que contribuem para especiação são mais susceptíveis de se acumular em alopatria ou sob condições de fluxo gênico restrito (Butlin, 2005). Na verdade, espécies de peixes caracterizadas por uma maior mobilidade e densidade populacional geralmente apresentam cariótipos mais conservados, como exemplificado por alguns peixes Neotropicais migratórios, como os Anostomidae, Prochilodontidae, Curimatidae, onde poucas ou quase nenhuma mudança é geralmente encontrada nos cariótipos das espécies (Bertollo et al., 1986; Oliveira et al., 1988). Pelo contrário, a ocorrência de uma alta variabilidade cariotípica é geralmente observada em grupos de peixes com baixa mobilidade e que apresentam pequenas populações isoladas umas das outras. Tais fatores contribuíram, por exemplo, para a grande variação cromossômica encontrada entre os peixes do gênero *Channa*, onde o número diplóide varia de $2n = 32$, em *C. punctata* a $2n = 112$, em *C. gachua*. Neste caso, rearranjos Robertsonianos, inversões pericêntricas e poliploidia estão presentes em diferentes espécies/populações,

despontando como as principais fontes de tal diversidade cromossômica (Rishi & Haobam, 1990; Kumar et al., 2013).

No entanto, outras características relacionadas com a própria organização genômica podem estar também implicadas na geração de variabilidade cromossômica, como exemplificado em Cricetidae. Nesta família, dois gêneros de lêmures, *Lemmus* e *Dicrostonyx*, possuem estruturas populacionais semelhantes. Contudo, ao mesmo tempo em que pouca variabilidade cromossômica está presente no primeiro, uma taxa mais elevada é encontrada no último (Gibson, 1984; Gileva, 1983). De fato, quebras cromossômicas durante o processo evolutivo não são eventos aleatórios, resultando em segmentos que são conservadas ao longo de milhões de anos, em contraste com outras regiões instáveis que são mais susceptíveis a rearranjos devido às suas características de sequência de base (Ruiz-Herrera et al., 2006). A fragilidade cromossômica tem sido associada com a evolução cariotípica em algumas espécies de mamíferos, tais como os cangurus do gênero *Petrogale* (Eldridge & Johnston, 1993) e primatas da família Cebidae (Mudry et al., 1995). Além disso, a tendência para fragilidade cromossômica é uma das teorias que podem explicar as amplas variações cromossômicas encontradas entre espécies de cervos do gênero *Mazama* (Duarte & Jorge, 1996). Portanto, nos casos analisados neste trabalho, além de seus estilos de vida diferentes, características inerentes aos próprios cromossomos podem também contribuir para os modelos evolutivos contrastantes presentes no gênero *Hoplias*. No entanto, outras diferentes abordagens, incluindo análises meióticas, assim como questões externas relacionadas com tamanho efetivo da população, fluxo gênico e dinâmica populacional constituem ferramentas úteis para o melhor esclarecimento deste cenário peculiar.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Sr. José Salles Alvim Junior, da piscicultura "Aquaminas", pelo fornecimento de alguns exemplares para esta pesquisa e ao Dr. Oswaldo T. Oyakawa, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) pela identificação das espécies. Agradecemos também à Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso - SEDUC-MT - pela licença concedida a Ezequiel Aguiar de Oliveira para realizar seus estudos de pós-graduação. Este trabalho foi apoiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Tabela 3. Locais de procedência das espécies de *Hoplias*, com os respectivos tamanhos amostrais e códigos de identificação do museu.

Espécies	Procedência	N	Depósito no Museu
<i>Hoplias brasiliensis</i>	Grão Mogol (MG) – rio Itacambirucú (bacia do rio Jequitinhonha)	08♂ 02♀	EAO2014103101
<i>Hoplias aimara</i>	Querência (MT) – (bacia do rio Xingu)	03♂ 01♀	EAO2014080302
<i>Hoplias intermedius</i>	Piscicultura Aquaminas (Poço Fundo – MG) (bacia do rio Paraná)	04♂ 04♀	EAO2014082801
<i>Hoplias lacerdae</i>	Piscicultura Aquaminas (Poço Fundo – MG) (bacia do rio Ribeira de Iguape)	02♂ 06♀	EAO2014082802

MT = Mato Grosso, MG = Minas Gerais

Figuras

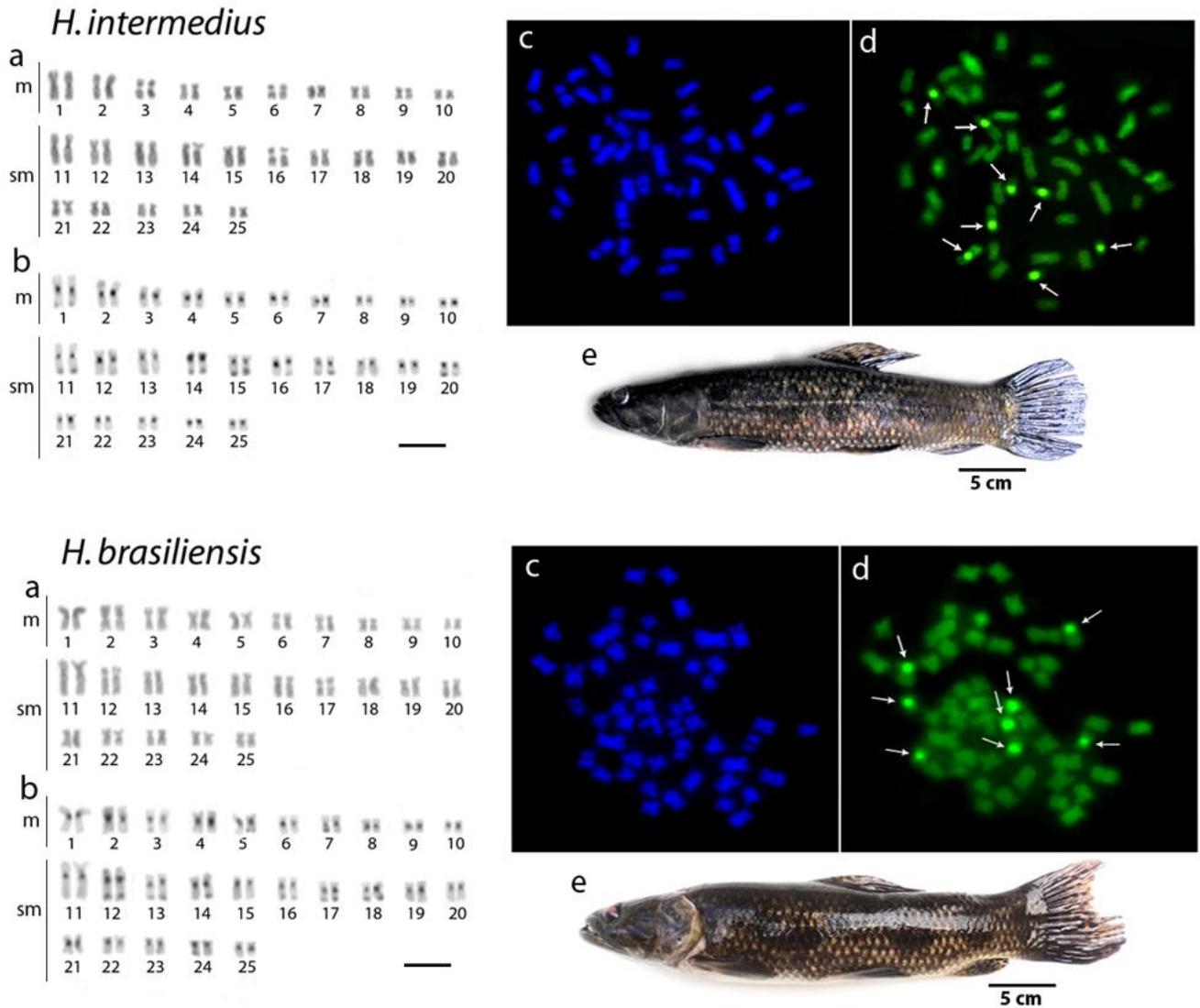


Figura 5. Cariótipos de *Hoplias intermedius* e *Hoplias brasiliensis* com coloração Giemsa convencional (a) e após Bandamento C (b) apresentando $2n=50$ cromossomos. (c) e (d) mostram metáfases destas espécies, coradas com DAPI (c) e Cromomicina A₃ (d), com destaque para os sítios CMA₃⁺, ricos em GC nos cromossomos. Em (e) são apresentadas fotos dos espécimes. Barra = 5 μ m

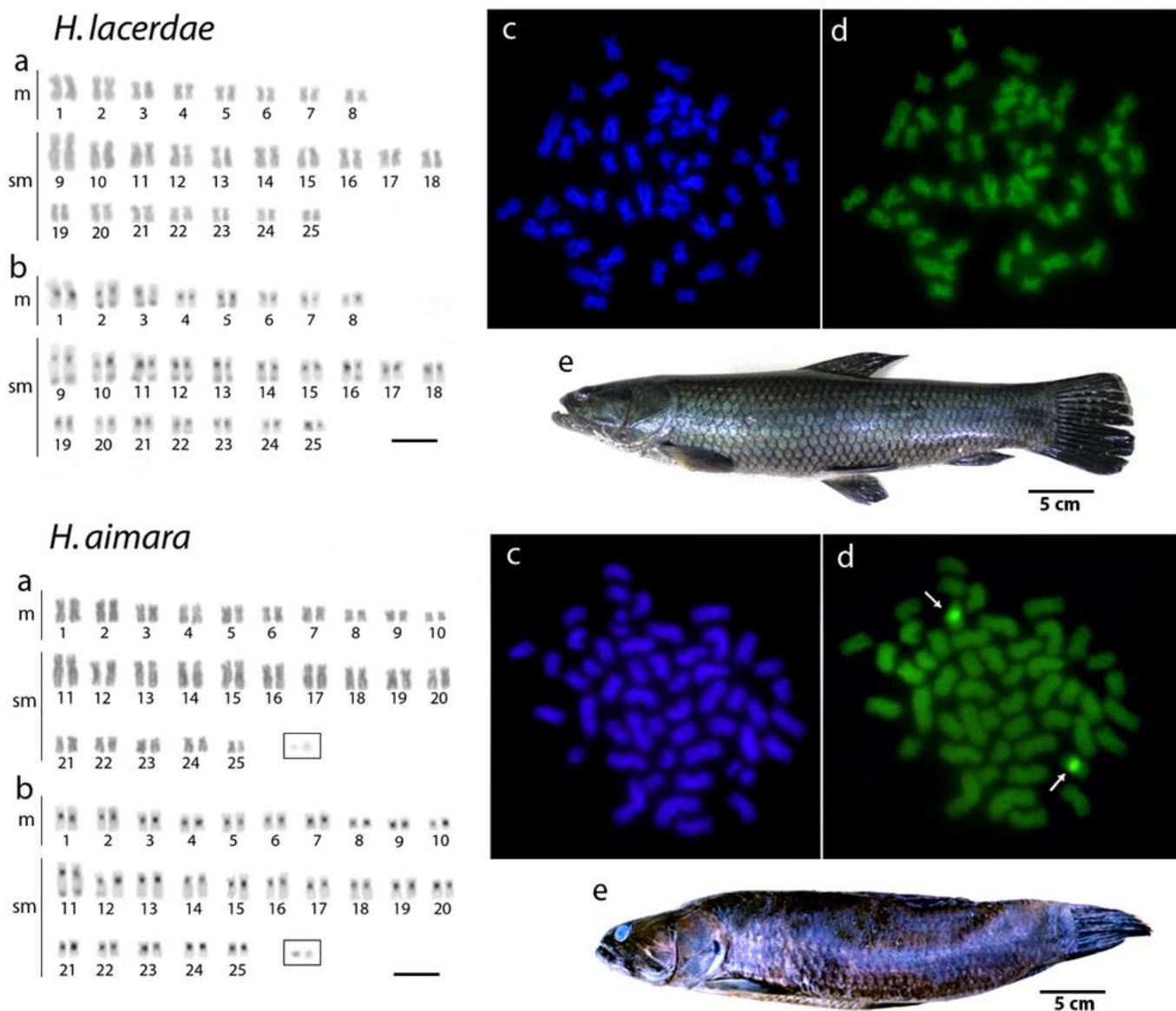


Figura 6. Cariótipos de *Hoplias lacerdae* e *Hoplias aimara* com coloração Giemsa convencional (a) e após Bandamento C (b) apresentando $2n=50$ cromossomos. (c) e (d) mostram metáfases destas espécies, coradas com DAPI (c) e Cromomicina A_3 (d). As setas indicam os sítios CMA_3^+ , ricos em GC nos cromossomos. Em (e) são apresentadas fotos dos espécimes. Barra = 5 μ m

Hoplias intermedius

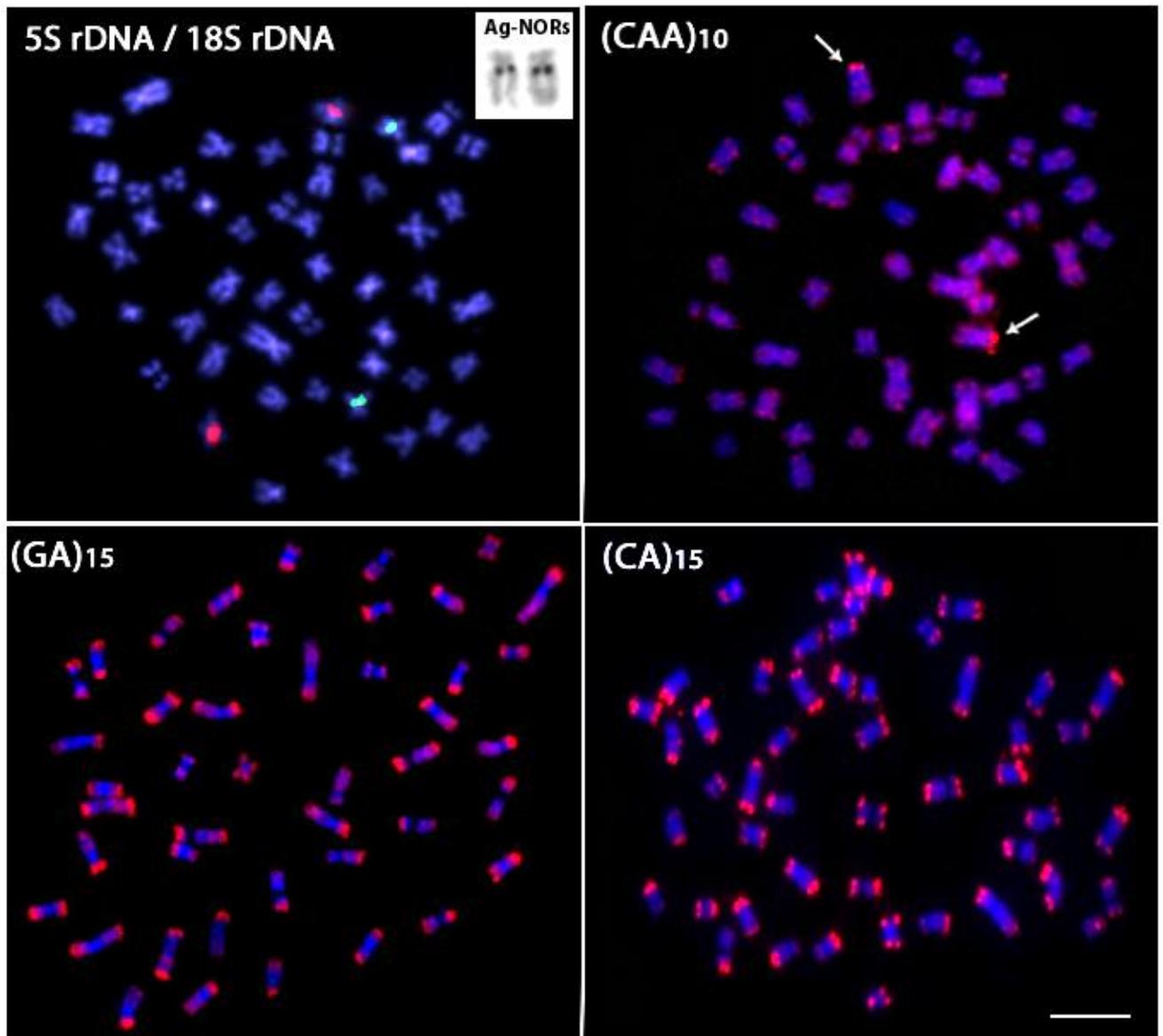


Figura 7. Placas metafásicas de *Hoplias intermedius* mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀. Observar o padrão de distribuição geral de microssatélites e a presença de sítio mais conspicuos de (CAA)₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.

Hoplias aimara

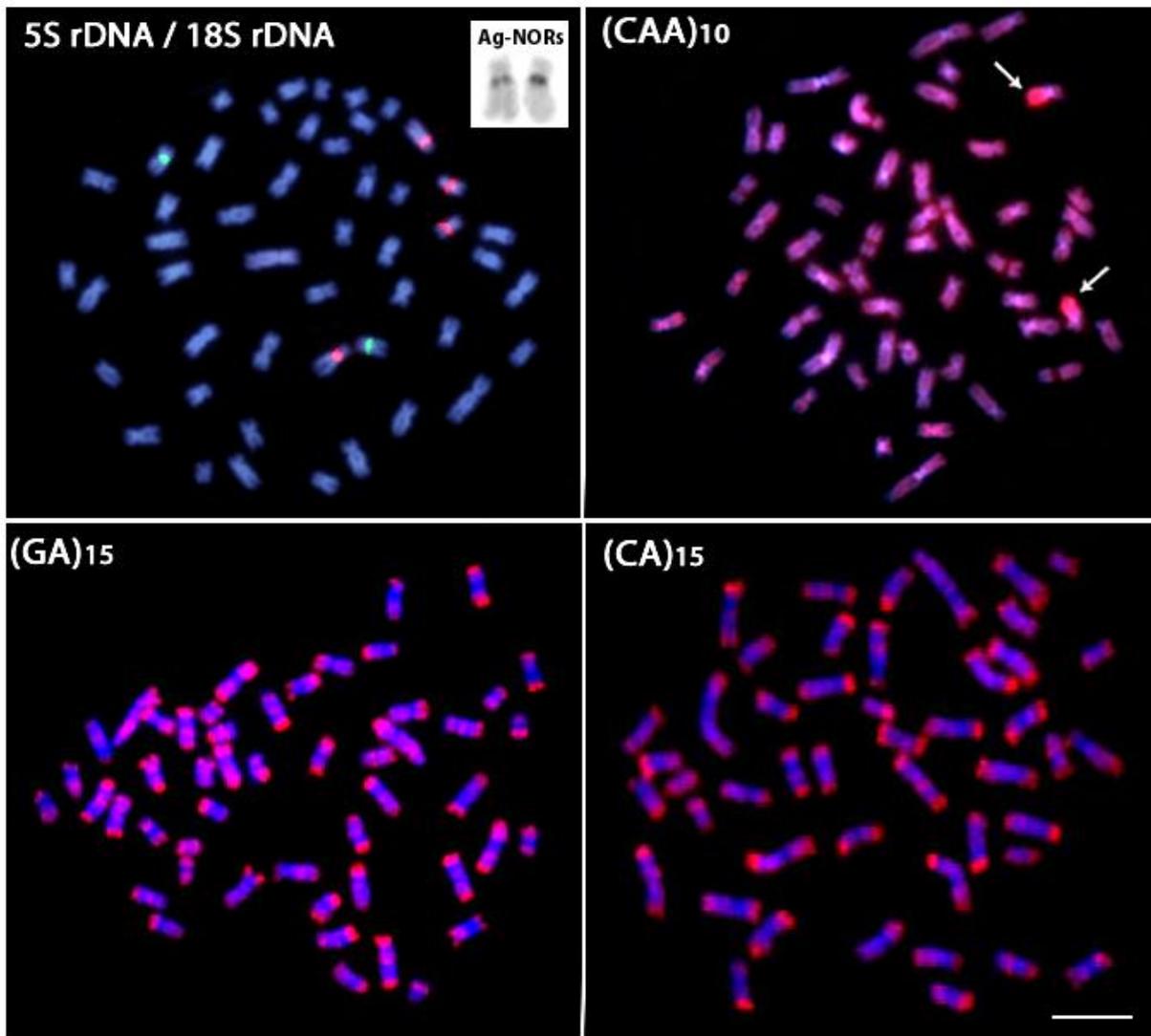


Figura 8. Placas metafásicas de *Hoplias aimara* mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀. Observar o padrão de distribuição geral dos microssatélites e a presença de sítios mais conspicuos de (CAA)₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.

Hoplias lacerdae

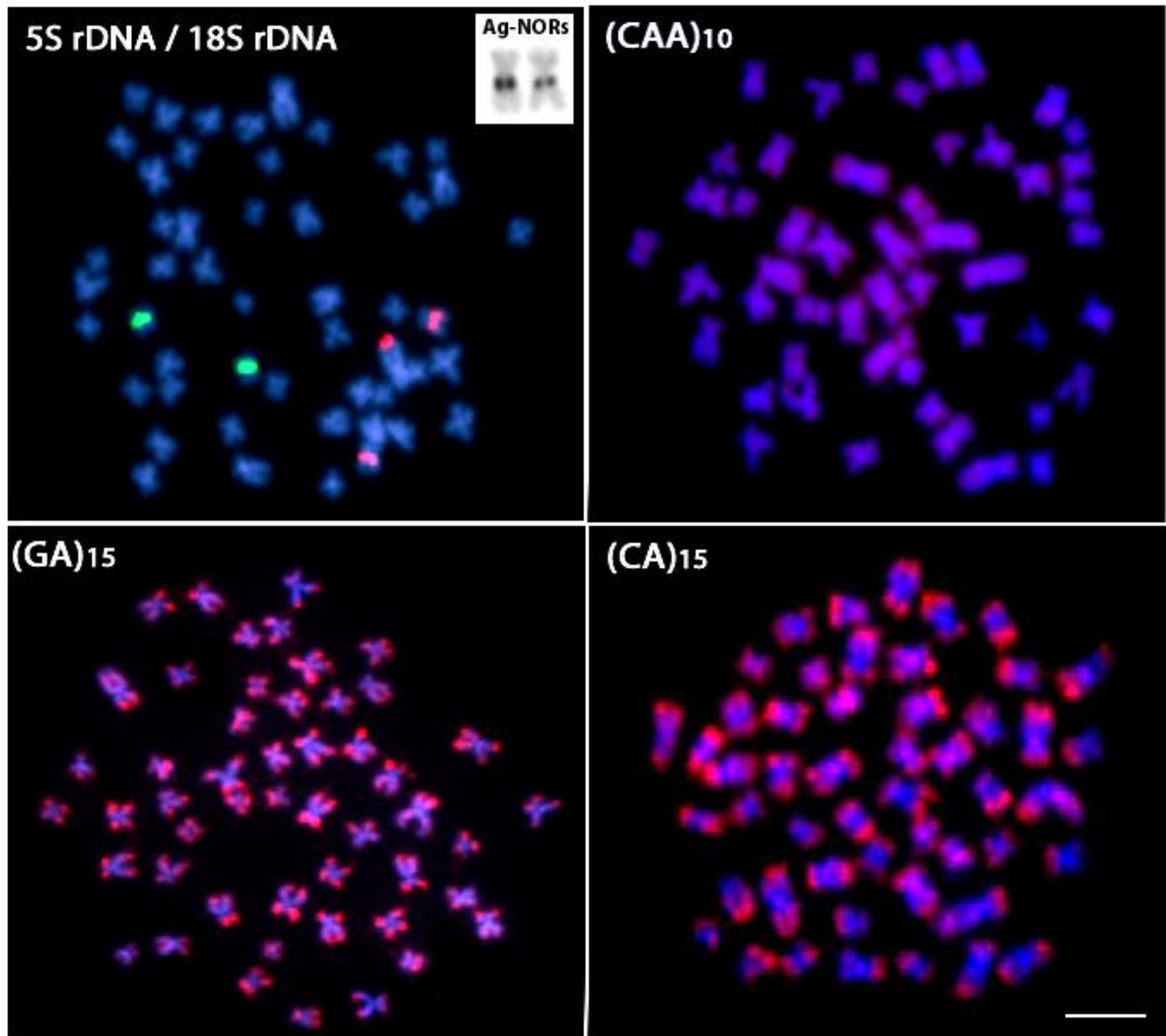


Figura 9. Placas metafásicas de *Hoplias lacerdae* mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀. Barra = 5µm.

Hoplias brasiliensis

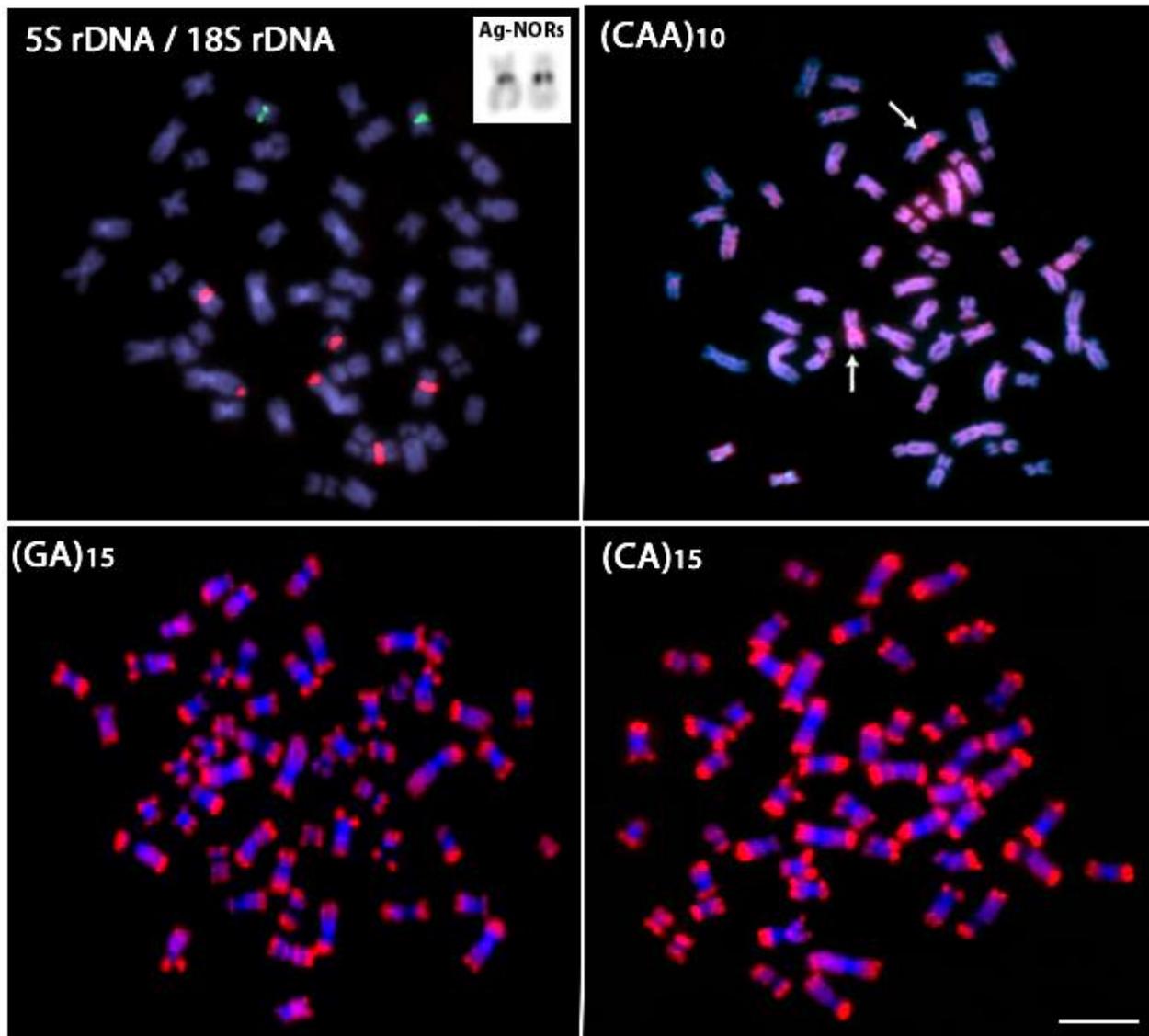


Figura 10. Placas metafásicas de *Hoplias brasiliensis* mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde) nos cromossomos, o par cromossômico portador de Ag-NORs e a distribuição dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (CAA)₁₀. Observar o padrão de distribuição geral dos microssatélites e a presença de sítio mais conspícuos de (CAA)₁₀ no braço curto de um par submetacêntrico (setas). Barra = 5µm.

Species	2n	Karyotype formula	NF	Ag-NORS	18S rDNA	5S rDNA	CMA ³ ₃ ⁺	(GA) ₁₅	(CA) ₁₅	(CAA) ₁₀
<i>H. intermedius</i>	50	20m - 30sm	100							
<i>H. brasiliensis</i>	50	20m - 30sm	100							
<i>H. aimara</i>	50	20m - 30sm + 1-2 Bs	100							
<i>H. lacerdae</i>	50	16m - 34sm	100				—			

Figura 11. Resumo das principais características cromossômicas das espécies de *Hoplias* investigadas no presente estudo.

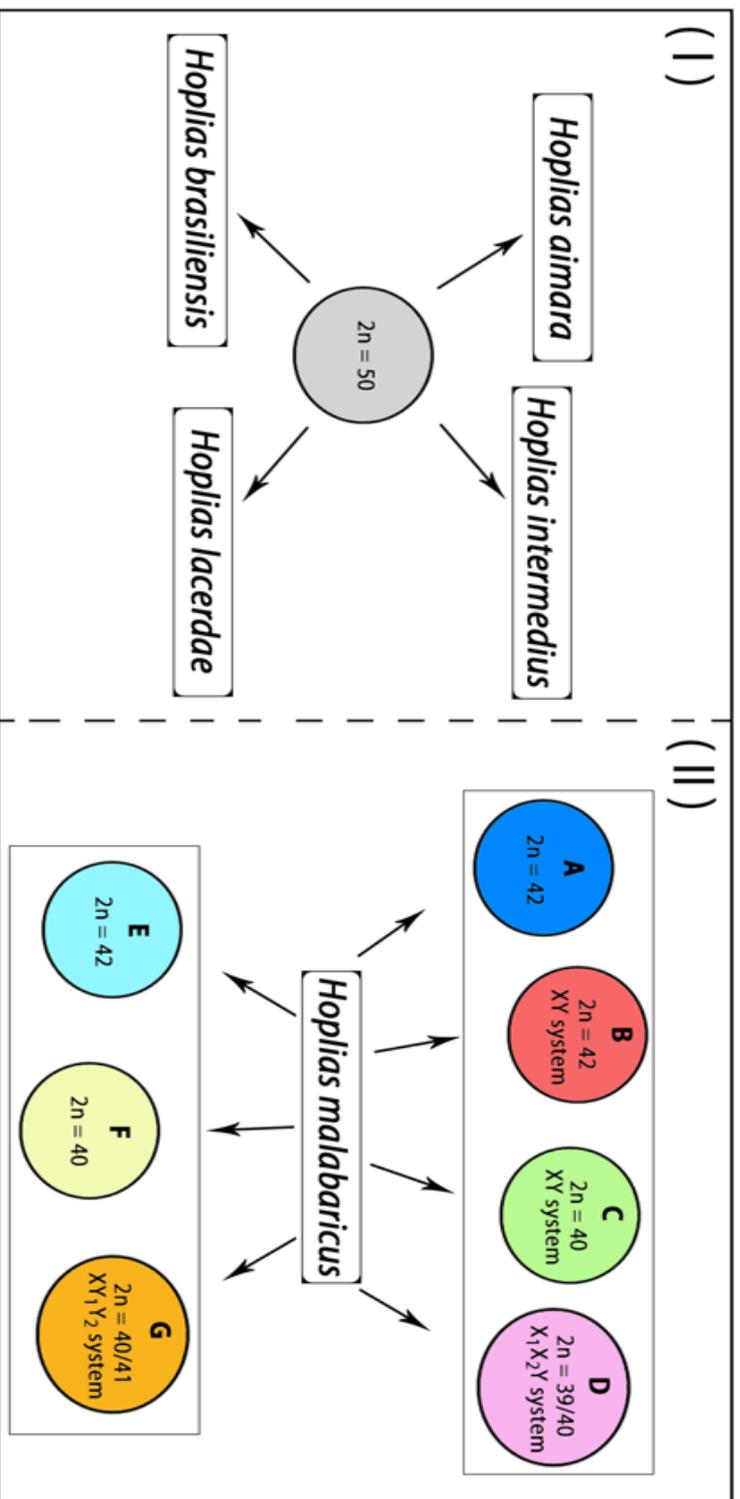


Figura 12. Padrão cariotípico conservativo (I) compartilhado por diferentes espécies de *Hoplias*, contrastando com cariótipos altamente divergentes (II) apresentados por representantes de *H. malabaricus*, com 07 cariomorfos (AG) indentificados. Em (II), cariomorfos presentes na mesma caixa compartilham características cromossômicas entre si, que diferem entre os dois conjuntos de *box* considerados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados evidenciaram uma grande homogeneidade na macroestrutura cariotípica, com $2n=50$ cromossomos e cariótipos compostos apenas por cromossomos meta- e submetacêntricos, com ausência de cromossomos sexuais heteromórficos, compartilhado pelas 04 espécies de *Hoplías* investigadas, ou seja, *H. lacerdae*, *H. intermedius*, *H. brasiliensis* e *H. aimara*. Adicionalmente, algumas particularidades específicas na microestrutura cariotípica destas espécies também se mostram presentes, evidenciadas pela análise de componentes da fração repetitiva do genoma. Tais diferenças são de fato esperadas, considerando o processo de especiação ocorrido, corroborando assim com a recente classificação taxonômica realizada nesse grupo de espécies. Entretanto, o que mais se destaca nessas espécies é o conservadorismo cromossômico presente na macro-estrutura do cariótipo. Este conservadorismo contrasta grandemente com o cenário encontrado na espécie congênica *H. malabaricus*, onde uma conspícua variação cromossômica pode ser observada entre distintas populações, inclusive com a presença de sistemas diferenciados de cromossomos sexuais em várias delas. Adicionalmente, uma significativa diversidade cariotípica também é encontrada em outros gêneros da família Erythrinidae, como *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. Assim sendo, o conjunto de espécies ora investigadas apresenta-se como uma exceção nesta família, onde a diversidade cariotípica entre espécies/populações tem sido a regra. Tal fato não se mostra usual, ainda mais considerando que espécies pertencentes a um mesmo gênero, como é o caso de *Hoplías*, apresentem modos tão divergentes de evolução cromossômica.

Tais diferenças podem estar relacionadas diretamente com seus modos de vida. De fato, *H. malabaricus* habita lagoas marginais e tem um comportamento mais lântico, tendendo a formar populações mais isoladas, propiciando assim a diferenciação genética inter-populacional. Por outro lado, as espécies ora analisadas vivem preferencialmente

em rios principais e tem um comportamento mais migratório, o que pode contribuir com a manutenção da uniformidade cariotípica observada.

Contudo, fatores adicionais podem estar também influenciando esta ocorrência. É conhecido, por exemplo, que sítios frágeis nos cromossomos podem propiciar a ocorrência de uma maior variabilidade no genoma de várias espécies de mamíferos. Portanto, além de seus estilos de vida diferentes, as características internas do genoma das espécies podem contribuir para os modelos evolutivos contrastantes presentes no gênero *Hoplias*. Buscando compreender ainda mais este cenário, abordagens multidisciplinares poderão elucidar a implicação de possíveis fatores inter-relacionados, tais como características moleculares intrínsecas das espécies e os processos meióticos associados com a origem de rearranjos cromossômicos, assim como características externas relacionadas ao tamanho efetivo da população, ao fluxo gênico e à dinâmica populacional.

7. BIOGRAFIA

Filho de produtores rurais nasceu em Crixás uma pequena cidade do interior do Estado de Goiás – Brasil. Até os seis anos viveu na “Fazenda Morro do Espia” um pequeno sítio da família localizado naquele município. Aos seis anos iniciou seus estudos e sua trajetória escolar para conclusão da educação básica, a qual se deu em quatro escolas (Escola Estadual Manoel Lino de Carvalho e Colégio Estadual João Xavier Ferreira - Crixás - GO, Centro de Ensino Médio Ary Ribeiro Valadão Filho e Colégio Paroquial Bernardo Sayão - Gurupi - TO). Aos dezessete anos iniciou, com apenas o ensino médio concluído, sua carreira como professor na Escola Rural Municipal de 1º Grau Nova Suiá e Escola Estadual Presidente Tancredo de Almeida Neves em São Félix do Araguaia – MT, lecionando para alunos do ensino fundamental e ensino médio. Em 2003 ingressou no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) em Luciara – MT. Em 2009 tornou-se professor efetivo de Biologia da Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso. Em 2011 e 2012 atuou como coordenador do Ensino Médio Regular e do Ensino Médio Técnico em Computação na Escola Estadual Presidente Tancredo de Almeida Neves, em São Félix do Araguaia – MT. Ainda em 2012 concluiu, pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), o curso de Especialização em Gestão Pública. Em 2014 concluiu pela AVM (Faculdades Integradas) em Brasília – DF o curso de especialização em Biologia Molecular. Neste mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pela Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP – Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Toledo LF. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari, RP, Lucena ZM & Lucena CA. eds Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p. 583-588.
- Bhargava A, Fuentes FF. Mutational dynamics of microsatellites. *Mol Biotechnol.* 2010; 44(3): 250-66.
- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP, Moreira-Filho O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. *J Fish Biol.* 2009; 75: 2313-2325.
- Bernor R, Armour-Chelu M, Gilbert H, Kaiser T, Schulz E. Equidae. In: Werdelin L, Sanders B, editors. Cenozoic mammals of Africa. Berkeley: University of California Press; 2010. p. 685-721.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet.* 1978; 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Takahashi, CS, Almeida-Toledo LF, Galetti Jr PM, Ferrari I, Moreira-Filho O, Foresti F. Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica. Ordem Cypriniformes. *Cienc. Cult. Suppl.* 1980; p. 32-753.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr PM. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol.* 1986; 28: 153-159.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and citotaxonomic considerations. *Chromosome Res.* 2000; 8: 603-613.
- Bertollo LAC. Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: An overview. In: Pizano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG, editors. *Fish Cytogenetics*. Science Publishers. Enfield; 2007. p. 195-211.
- Biemont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature.* 2006; 443: 521-524.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O. Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. *Neotrop Ichthyol.* 2010; 8: 361-368.
- Blanco DR, Lui RL, Vicari MR, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA

and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 132: 71–78.

Britski H A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura: São Paulo; 1972. p. 79-108.

Bush GL, Case SM, Wilson AC, Patton JL. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1977; 74: 3942-3946.

Bush GL. Modes of animal speciation. *Ann Rev Eco Syst.* 1975; 6: 339-364.

Butlin RK. Recombination and speciation. *Mol Ecol.* 2005; 14: 2621–2635.

Cavallini, MM, Bertollo, LAC. Indução de mitoses em *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Maringá – PR; 1988. p. 32.

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet.* 2009a; 10:34.

Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res.* 2009b; 125: 132–141.

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol.* 2010; 10: 271.

Cioffi, MB. Evolução cromossômica na família Erythrinidae: Mapeamentos citogenéticos de DNAs repetitivos e microdissecção de cromossomos sexuais. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP; 2011.

Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 132: 289-296.

Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. *BMC Evol Biol.* 2011; 11:186.

Cioffi MB, Molina, WF, Artoni RF, Bertollo LAC. Chromosomes as tools for discovering biodiversity. The case of Erythrinidae fish family. In: Tirunilai P, editor. Recent Trends in Cytogenetic Studies. Methodologies and Applications. Rijeka: Intech; 2012. p. 125-146.

- Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos MA, editors. *Genome Dynamics*. Basel: Karger; 2012. p. 197–221.
- Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF, Bertollo LAC. Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: A molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenet Genome Res*. 2013; 141: 86-194.
- Costa AC, Loh SH, Martins LM. *Drosophila* Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2013; 4e: 467.
- Duarte JMB, Jorge W Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. *Arch Zootec*. 1996; 45: 281-287.
- Eldridge MDB, Johnston PG, Chromosomal rearrangements in rock wallabies, *Petrogale* (Marsupialia: Macropodidae). VIII. An investigation of the non-random nature of karyotypic change. *Genome*. 1993; 36: 524-534.
- Foresti F, Almeida Toledo LF, Toledo FSA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*. 31: 137–144.
- Foresti F, Oliveira C and Almeida-Toledo LF. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*. 1993; 49: 810-813.
- Galetti Jr PM, Bertollo LAC, Moreeira-Filho O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia*. 1994; 47: 289-298.
- Gibson LJ. Chromosomal changes in mammalian speciation: a literature review. *Origins*. 1984; 11: 67-89.
- Gileva EA. A contrasted pattern of chromosome evolution in two genera of lemmings, *Lemmus* and *Dicrostonyx*. *Genetica*. 1983; 60: 173–179.
- Gornung E. Twenty Years of Physical Mapping of Major Ribosomal RNA Genes across the Teleosts: A Review of Research. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141:90-102.
- Gontijo, VPM. Produção consorciada de trairão e tilápia. *Inf. Agropec*. 1984; 10: 26-29.
- Gregory TR. Genome size evolution in animals. In: Gregory TR (Ed.) *The evolution of the genome*. Elsevier: San Diego, CA; 2005. p. 3-87.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36: 1014-1015.
- Kent M. Reed & Ruth B. Phillips (1997) Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromosome Res*. 1997, 5, 221–227.

- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*. 2008; 51: 350–356.
- Kumar R, Kushwahaa B, Nagpurea NS, Beherab BK, Lakrac WS. Karyological and molecular diversity in three freshwater species of the genus *Channa* (Teleostei, Perciformes) from India. *Caryologia*. 2013. 66: 109-119.
- Levan A, Fredgra K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52: 201-220.
- Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MLJ, Tedesco PA. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*. 2007; 595: 554-567.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos MA, editor. *Genome Dynamics*. Basel: Karger; 2012. p. 1-
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP & Moreira-Filho O. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Mícron*. 2009; 40: 552-559.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Machella N, Caputo V. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica*. 2001; 110:73–78.
- Marques DF, Dos Santos FA, Da Silva SS, Sampaio I, Rodrigues LRR. Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotrop. ichthyol.* 2013; 11(2): 459-466.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*. 2006; 127:133–14.
- Martins C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: Pizano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG, editors. *Fish Cytogenetics*. Enfield: Science Publishers; 2007. p. 421-452.
- Martins NF, Bertollo LAC, Troy WP, Feldberg E, Valentin FCS, Cioffi MB. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Rev Fish Biol Fisher.* 2013; 23: 261-269.
- Mattox GT, Toledo-Piza M, Oyakawa OT. Taxonomic study of *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae). *Copeia*. 2006; 516-528.

- Mayden RL, Tang KL, Conway KW, Freyhof J, Chamberlain S et al. Phylogenetic relationship of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J Exp Zool Mol. Dev. Evol.* 308B. 2007; 5: 642-654.
- Mayr B, Kalat M, Ráb P. Localization of NORs and counterstain enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica.* 1985; 67: 51-56.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics.* 1991; 14: 331-357.
- Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Braz J Biol.* 2007; 67: 897-903.
- Mudry M, Fundia A, Hick A, Gorostiaga MA. Labilidad cromosómica: una posible explicación en el origen de los reordenamientos cromosómicos en cébidos. *Bol Primatol Lat.* 1995; 5: 7-15.
- Naorem S, Bhagirath T. Chromosomal differentiations in the evolution of channid fishes – molecular genetic perspective. *Caryologia.* 2006; 59: 235-240.
- Nelson JS. *Fishes of the World.* John Willey & Sons Inc: New York 4th Ed., 2006. 624p.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski H, Toledo-Filho SA. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Braz J Genet.* 1988; 11: 577-624.
- Oyakawa OT. Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo lacerdae) da Amazônia Brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae). Unpublished Master Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1990; 114p.
- Oyakawa OT. Family Erythrinidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ, editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p. 238-240.
- Oyakawa OT, Mattox MT. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotrop Ichthyol.* 2009; 7: 117-140.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update.* 2011; 17(4): 476-94
- Petrovi DA. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Opinion, Trends Genet.* 2001; 17: 23-28.
- Phillips RB, Hartley SE. Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome.* 1988; 30:193-197.

- Pinkel D, Straume T, Gray J. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 2934-2938.
- Prothero DR, Schoch RM. Classification of the Perissodactyla. In: Prothero DR, Schoch RM, editors. *The evolution of perissodactyls*. New York: Oxford University Press; 1989. p. 530-537.
- Rabosky DL, Santini F, Eastman J, Smith SA, Sidlauskas B, Chang J, et al. Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. *Nat Commun*. 2013; 4:1958.
- Rábová M, Ráb P, Ozouf-Costaz C, Ene C, Wanzeböck J. Comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the fish genus *Vimba* (Cyprinidae). *Genetica*. 2003; 118: 83-91.
- Radinsky LB. New Pantodonta and Dinocerata from the Upper Paleocene of Western Colorado. *Field Mus Nat Hist Geol*. 1966; 6: 351-384.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res*. 2008; 120: 351–357.
- Rishi KK, Haobam MS. A chromosomal study on four species of snakeheads (Ophiocephalidae: Pisces) with comments on their karyotypic evolution. *Caryologia*. 1990; 43: 163–167.
- Rosa R da, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). *Rev Fish Biol Fisher*. 2012; 22: 467-475.
- Ruiz-Herrera A, Castresana J, Robinson TJ. Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biol*. 2006; 7: R115.
- Ryder OA, Epel NC, Benirschke K. Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet Cell Genet*. 1978; 20: 332–350.
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*. 1980; 7: 83–103.
- Shapiro JA, Sternberg R. Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev*. 2005; 80: 1-24.
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rash EM, Monaco PJ. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining. *Cytogenet Cell Genet*. 1992; 60: 229-235.
- Souza IL, Galián J, De La Rúa P, Bertollo LAC, Moreira Filho O. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia*. 2001; 66: 85–91.

- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972; 75: 304–306.
- Sumner AT. *Chromosomes: Organization and Function.* Blackwell Science Ltd: Norths Berwich, UK, 1st ed., 2003. 287p.
- Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 4127-4138.
- Trifonov VA, Stanyon R, Nesterenko AI, Fu BY, Perelman PL, O'Brien PCM, et al. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Res.* 2008; 16: 89-107.
- Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ruas CF, et al. Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia.* 2002; 67:9-13.
- Venkatesh B. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13: 588-592.
- Volff JN. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity.* 2005; 94: 280–294.
- Wainwright PC, Reilly SM. *Ecological morphology: integrative organismal biology.* Chicago:University of Chicago Press; 1994.
- Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ. Genomic distribution of heterochromatin sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered.* 1991; 82: 369-377.
- Wicker TW, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev.* 2007; 8: 973-982.
- Wilson AC, Bush GL, Case SM, King MC. Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1975; 72:5061-5065.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triporthus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PloS One.* 2014; 9: e90946.