

Cristian Andrés Araya Jaime

**Caracterização citogenética do gênero *Eigenmannia*
(Teleostei:Gymnotiformes) das bacias Amazônicas, do Prata e do rio
São Francisco: Inferências sobre a diversificação cariotípica e origem e
evolução dos cromossomos sexuais**

Doutorado

Botucatu

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Caracterização citogenética do gênero *Eigenmannia*
(Teleostei:Gymnotiformes) das bacias Amazônicas, do Prata e do rio
São Francisco: Inferências sobre a diversificação cariotípica e origem e
evolução dos cromossomos sexuais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor

Cristian Andrés Araya Jaime

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

**Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato
Alves**

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Araya Jaime, Cristian Andrés.

Caraterização citogenética do gênero *Eigenmannia* (Teleostei:Gymnotiformes) das bacias Amazônicas, do Prata e do rio São Francisco : inferências sobre a diversificação cariotípica e origem e evolução dos cromossomos sexuais / Cristian Andrés Araya Jaime. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Fausto Foresti
Coorientador: José Carlos Pansonato Alves
Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Teleósteos. 3. Citogenética. 4. Meiose. 5. Genética molecular. 6. Cromossomos sexuais.

Palavras-chave: Citogenética; *Eigenmannia*; Identificação molecular; Meiose; cromossomos sexuais.

*Dadas as circunstâncias corretas, não mais do que na base dos sonhos,
determinação e liberdade para tentar, muitas pessoas comuns fazem
constantemente coisas extraordinárias.*

Dee Ward Hock

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Primeiramente, quero agradecer a toda minha família que, mesmo longe, sempre estiveram junto comigo, me fazendo sentir perto e me apoiando em todos os momentos desta etapa e durante minha vida toda. Em especial minha mãe Maria, meu pai Jorge e minha irmã Maria Constanza.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por me orientar, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo exemplo, pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos.

Aos técnicos Renato Devidé e Ricardo Teixeira, pelo seu bom humor, apoio constante e inúmeras histórias vividas juntos em coletas.

A todos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp de Botucatu. Obrigado a todos vocês por se tornarem minha família nestes quatro anos longe de casa. Sem a sua amizade com certeza tudo teria sido muito mais difícil. Obrigado por cada risada, por cada café e por todos esses momentos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento como pessoa.

Quero também agradecer a meus amigos da "divisão" citogenética do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Ricardo, Priscilla, Érica, Duilio, Cristiano, Viviane e Fabilene. Agradeço a cada um de vocês por sua importante e significativa ajuda no meu desenvolvimento como pesquisador e no sucesso do meu trabalho científico. Mais que colegas de trabalhos eu ganhei amigos para a vida toda.

Em especial quero agradecer a uma das alunas mais novas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Nadayca, por ter sido minha companheira nesta fase final da minha formação, por todo o carinho e amor entregue sem condições, pela colaboração importantíssima na elaboração desta tese e por todos os momentos de felicidade que eu vivi do seu lado.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu- SP) e ao Departamento de Morfologia, que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

À Comisión Nacional de Investigación Ciencia y Tecnología (CONICYT), departamento de Formación de Capital Humano Avanzado e ao Programado Doutorado no exterior BECAS-CHILE, pela bolsa de estudos e por acreditarem na minha capacidade.

Resumo

No presente trabalho, foram analisadas seis espécies/citótipos de peixes do gênero *Eigenmannia*, sendo *E. microstoma*, *E. limbata*, *E. virescens*, *E. aff trilineata*, *Eigenmannia* sp1 e *Eigenmannia* sp2, de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas citogenéticas básicas envolvendo a coloração com Giemsa e bandamento C e também técnicas de citogenética molecular, com a aplicação de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) envolvendo o uso de sondas de DNAr 18S e 5S, DNA histônico H3/H4 e de RNAsn U2. Também foi estudado o comportamento meiótico e o nível de diferenciação do sistema múltiplo de cromossomos sexuais de *Eigenmannia* sp2 por imunodeteção de proteínas do complexo sinaptonêmico (SYCP3), proteínas relacionadas com a atividade da cromatina (H3K9me) e marcadores do tipo proteína γ H2AX envolvida no reparo das quebras do DNA e associadas ao nível de pareamento dos bivalentes nos cromossomos meióticos. Finalmente, os dados da caracterização citogenética foram comparados com análises de DNA barcode para permitir uma melhor delimitação das espécies/citótipos analisados neste estudo. Os representantes analisados deste grupo confirmaram a apresentação de expressiva variação no número diplóide, tendo sido observados deste cariótipos compostos por 28 cromossomos em *Eigenmannia* sp1 até o número diplóide de 38 cromossomos em *E. microstoma*, *E. limbata* e *E. virescens*. Em *E. aff trilineata* foi descrita pela primeira vez a ocorrência de um polimorfismo cromossômico do tipo ZZ/Z0 associado ao sexo, em que os machos apresentam cariótipos compostos por 32 cromossomos enquanto as fêmeas possuem cariótipos constituídos por 31 cromossomos. Sequências de DNAr 5S e RNAsn U2 foram localizadas em diferentes cromossomos, com variação na quantidade de sítios entre as espécies, enquanto o DNAr 18S apresentou-se conservado em relação ao número de cromossomos portadores, porém variando na sua localização no cariótipo

das espécies. As análises meióticas feitas nos cromossomos sexuais de *Eigenmannia* sp2, mostram a conformação de um trivalente sexual X_1X_2Y completamente sináptico, sem a presença de regiões não pareadas e de cromatina inativa ao longo de toda sua estrutura. Estes dados permitem supor que este sistema de cromossomos sexuais seria um rearranjo recente, podendo simplesmente trata-se de um caráter ligado ao sexo fixado nesta população. Todas as seis espécies/citótipos de *Eigenmannia* aqui analisadas são facilmente identificáveis pela sua macroestrutura cromossômica, referente ao número diplóide e fórmula cariotípica. A aplicação de metodologia baseada nas análises de DNA barcode conseguiu recuperar estes mesmos seis agrupamentos, mesmo quando foram incorporadas à análise sequências de COI para outros representantes do gênero, com valores de divergência genética (K2P) maiores que 2,5% entre as espécies. Assim, estes resultados permitiram identificar estes citótipos como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU), sugerindo que podem tratar-se de espécies crípticas, ainda com baixo nível de diferenciação morfológica, mas alto valor de diferenciação genética. A integralização de abordagens cromossômicas e de identificações moleculares foi utilizada na tentativa de melhor compreender questões relacionadas à biologia evolutiva de *Eigenmannia*, permitindo uma perfeita delimitação das espécies neste grupo.

Abstract

In the present study, six species/cytotypes from the genus *Eigenmannia* collected at different Brazilian hydrographic basins were analyzed, including *E. microstoma*, *E. limbata* and *E. virescens*, *E. aff. trilineata*, *Eigenmannia* sp1, and *Eigenmannia* sp2 using classical (Giemsa conventional staining and C-banding) and molecular cytogenetic techniques (fluorescence in situ hybridization with 5S and 18S rDNA, H3/H4 histone genes and U2 snDNA probes). Besides that, it was studied the meiotic behavior and the differentiation level of multiple sex chromosome system in *Eigenmannia* sp2 by immunodetection for synaptonemal complex proteins (SYCP3), proteins related to chromatin activity (H3K9me) and associated markers with the bivalent level pairing of the meiotic chromosomes (γ H2AX). Finally, the cytogenetics results were analyzed in conjunction with the barcode DNA analysis for a better delineation of species/cytotypes studied. The analyzed species/cytotypes showed diploid number variation, with diploid numbers ranging from 28 chromosomes in *Eigenmannia* sp1 to 38 chromosomes in *E. microstoma*, *E. limbata* and *E. virescens*. In *E. aff. trilineata*, for the first time, showed a ZZ/ZO sex chromosome system, where males have karyotypes with 32 chromosomes to 31 chromosomes to females. 5S rDNA and U2 snDNA were located on different chromosomes, with variations on the number of clusters in the different species, while the 18S rDNA was conserved in number of sites per genome and variable in location. The meiotic analysis in the sex chromosomes of *Eigenmannia* sp2 showed a completely synaptic sexual trivalent X_1X_2Y formation without unsynaptic presence and inactive chromatin regions throughout its structure. These results suggest that this sex chromosomes system would be a recent rearrangement or simply it is a sex-linked character in this population. All the six species/cytotypes of *Eigenmannia* analyzed were easily identified by their macro

chromosomal structure (diploid number and karyotypic formula), the barcode DNA analysis were able to recover these same six groupings, even when they were incorporated into COI analysis to other representatives the genre, with genetic divergence values (K2P) between the species greater than 2.5%. These results allow identify these cytotypes as Taxonomic Operations (OTUs), which indicates cryptic species with low morphological differentiation level, but high-value genetic differentiation. The integration of chromosome and molecular data was used to better understand the evolutionary biology of *Eigenmannia* fishes.

Conteúdo

1. Introdução	1
1.1 Citogenética de Peixes Neotropicais: Caracterização da Biodiversidade e Evolução da Ictiofauna	1
1.2 Citotaxonomia de <i>Eigenmannia</i> .	5
2. Objetivos	8
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Material biológico	9
3.2 Métodos	9
3.2.1 Estimulação de mitoses	10
3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos	11
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) pela impregnação com nitrato de Prata (AgNO ₃)	12
3.2.4 Identificação da heterocromatina constitutiva	13
3.2.5 Extração de DNA genômico	14
3.2.6 Preparação das sondas de DNA para FISH	14
3.2.7 Hibridação in situ fluorescente	17
3.3 Estudos cariotípicos	19
3.4 Cromossomos meióticos	20
3.4.1 Obtenção de cromossomos meióticos	20
3.4.2 Imunodeteção de proteínas do complexo sinaptonêmico (SYCP3), de regiões inativas da cromatina (H3K9me) e de regiões não sinaptadas (γ H2AX)	21
3.5 Análise molecular (DNA barcoding)	22
4. Resultados e Discussão	25
4.1 Análise cariotípica e mapeamento cromossômico de 5 classes de DNA repetitivo no gênero <i>Eigenmannia</i> (Gymnotiformes: Sternopygidae): Inferências na organização do genoma.	26

4.2 Eigenmannia sp2 X ₁ X ₂ Y: Sistema múltiplo de cromossomos sexuais ou caráter ligado ao sexo? Novas evidências citogenéticas sobre a formação do cromossomo Y.	45
4.3 Delimitação de espécies utilizando DNA barcode e análises citogenéticas em representantes de peixes do gênero Eigenmannia (Gymnotiformes: Sternopygidae).	60
5. Considerações finais	75
6. Referências Bibliográficas	78

1. Introdução

1.1 Citogenética de Peixes Neotropicais: Caracterização da Biodiversidade e Evolução da Ictiofauna

A fauna de peixes Neotropicais é a mais rica do planeta (Schaffer, 1998; Lévêque et al, 2008) sendo que, das 13 mil espécies de água doce descritas, cerca de 6.000 são endêmicas dessa região (Reis et al, 2003) e aproximadamente metade delas ocorre no Brasil (Buckup, 2007).

Os estudos citogenéticos em peixes tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos devido ao emprego de novas técnicas de análise cromossômica, o que tem possibilitado à citogenética contribuir mais efetivamente, não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica e da organização do genoma dos vertebrados (Volf 2004). Estes avanços técnicos têm se refletido numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos, incluindo mais de 1000 espécies de peixes de água doce da região Neotropical (Oliveira and Almeida-Toledo 2007). Este levantamento realça também outras características do genoma dos peixes, como a presença de cromossomos supranumerários, que foram descritos como ocorrentes em 4% das espécies, e de heteromorfismos cromossômicos ligados ao sexo, que resultaram na identificação de cromossomos sexuais em aproximadamente 6% das espécies, entre as quais 4% com heterogametia feminina e 2% com heterogametia masculina. Estes resultados atualmente demonstram um aumento substancial das informações sobre o cariótipo e à estrutura cromossômica das espécies de peixes quando comparados ao levantamento realizado anteriormente por (Oliveira and Almeida-Toledo 2007), além de indicar

também que esses dados são ainda incipientes se forem consideradas as estimativas da diversidade da ictiofauna para esta região biogeográfica.

A crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico em peixes, notadamente as de bandas C e bandas de endonucleases de restrição, bem como o emprego de fluorocromos base específicos como a Cromomicina A3 e o DAPI, para identificar segmentos específicos dos cromossomos, permitiram inicialmente não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (Almeida-Toledo. et al.2000). O desenvolvimento recente de diferentes metodologias que possibilitam a aplicação de sondas específicas, como aquelas para genes ribossômicos e histonas, constituídas por DNA de moderada repetitividade, ou de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) (Singer 1982; Wright 1998), assim como o advento da técnica da microdissecção cromossômica (Henning et al. 2008b), que possibilita o isolamento direto de segmentos de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem possibilitado a associação destes marcadores com as regiões correspondentes nos cromossomos metafásicos, quando aplicada a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

A área da citogenética, de modo geral, sofreu o grande impacto positivo com a implementação da técnica de FISH, que permite a localização cromossômica de sequências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros. Neste sentido, tem sido considerada uma ferramenta interessante para os estudos de mapeamentos cromossômicos, uma vez que permite correlacionar informações moleculares com a localização física de segmentos genômicos específicos, obter informações mais precisas sobre a presença/ausência de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas (Reed and Phillips 1995; Wright 1998; Martins 2007). Em humanos,

quando aliada às metodologias de citogenética clássica, esta técnica tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica na caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer et al. 1992; Wiltshire et al. 2001; Hu et al. 2004). No contexto da evolução cromossômica, a metodologia de FISH tem sido utilizada na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Neusser et al. 2005; Nieves et al. 2005), cervídeos (Li et al. 2005) e roedores (Fagundes et al. 2000; Marchal et al. 2004). Nos últimos anos, o desenvolvimento de sondas específicas de DNA possibilitou a hibridização destes marcadores também em cromossomos metafásicos de peixes,

A grande maioria dos estudos de componentes da ictiofauna Neotropical que utilizam a técnica de FISH envolve principalmente a utilização e localização de sondas constituídas por segmentos de DNA repetitivo nos componentes do cariótipo das espécies. Este tipo de sequência é caracterizado por apresentar alta variabilidade e constitui uma fração considerável do genoma de muitos eucariotos (Charlesworth et al. 1994), podendo ser identificado na forma de repetições in tandem, que incluem os segmentos de DNA satélites, minissatélites e microssatélites; como elementos transponíveis (TEs), que englobam transposons e retrotransposons; e ainda as famílias multigênicas representadas por sequências repetidas codificadoras, como é o caso de genes ribossomais e para histonas (Sumner 2008; Nagoda et al. 2005)

O mapeamento cromossômico de sítios de DNA repetitivo vem sendo utilizado com sucesso nos estudos citogenéticos em peixes. A localização física de elementos transponíveis nos cromossomos mitóticos permitiu avanços no entendimento da dinâmica e evolução desta classe de DNA repetitivo, além de permitir uma melhor visualização da distribuição de segmentos gênicos específicos nos cromossomos. Através do mapeamento de elementos retrotransponíveis Rex1 e Rex3 em espécies de

Loricariidae, Ferreira et al. (2011) observaram um padrão de distribuição disperso em regiões eucromáticas e heterocromáticas para ambos os elementos, sugerindo que essas sequências estariam evoluindo em conjunto ou através do mesmo mecanismo. Por outro lado, mapeando os elementos Rex1, Rex3 e Rex6 em ciclídeos, Valente et al. (2011) observaram estas sequências distribuídas de modo disperso no genoma, bem como detectaram grandes blocos pericentroméricos marcados em algumas espécies, postulando que esses elementos seriam capazes de se acumular em regiões genômicas específicas dentro de cada grupo de peixes.

A detecção de repetições teloméricas também vem sendo utilizada com frequência, visando elucidar os processos envolvidos na evolução cariotípica em diferentes grupos. Estudando dois citótipos da espécie *Gymnotus carapo* ($2n=40$ e $2n=42$ cromossomos), Milhomem et al. (2008) detectaram sítios teloméricos intersticiais (ITS) nos cromossomos do citótipo com $2n=40$, que possivelmente foram originados a partir de uma fusão cêntrica ocorrida nos cromossomos componentes do citótipo $2n=42$, sugerindo a existência de espécies crípticas neste grupo. Por outro lado, deve ser considerada também a possibilidade de que a identificação de tais marcadores de sequências teloméricas apenas nas regiões terminais nos cromossomos de certas espécies seja decorrente do fato de que transformações ocorridas nestas sequências após a ocorrência de fusões cromossômicas tenham promovido alterações que não possibilitaram sua identificação e hibridação com as sequências do marcador.

Além das abordagens citadas, o mapeamento físico de sequências repetitivas codificadoras também vem sendo realizado com sucesso em peixes. Hashimoto et al. (2011), ao localizarem os genes para histonas H1 e DNAr 5S em três espécies de *Astyanax* afirmam que a presença destes genes em sintonia em um único par cromossômico seria uma condição comum para o gênero. Além disso, postulam que

A. bockmanni e *A. fasciatus* seriam mais relacionadas entre si do que com *A. altiparanae* pelo fato de ambas as espécies possuírem clusters adicionais de DNAr 5S em um par de cromossomos acrocêntricos, característica não compartilhada pela última espécie. O sequenciamento dos genes confirmou os resultados filogenéticos obtidos pela citogenética.

Numa visão mais abrangente, pode ser considerado que os estudos citogenéticos em peixes têm permitido o esclarecimento sobre questões taxonômicas, avanços no entendimento da estrutura cromossômica, uma melhor compreensão sobre os processos carioevolutivos que envolvem os grupos de peixes Neotropicais, bem como a identificação de espécies crípticas (Oliveira and Almeida-Toledo 2007). Estes estudos permitem caracterizar a organização estrutural de determinadas sequências repetitivas e sua dinâmica estrutural e funcional no genoma dos organismos, revelando a importância do DNA repetitivo na evolução do genoma dos eucariotos. Além disso, os resultados têm auxiliado na compreensão dos processos evolutivos atuantes no genoma e fornecem subsídios para diversos estudos que incluem os já citados de diversidade, morfologia, taxonomia e filogenia, cujo conhecimento incompleto foi apontado Malabarba et al. (1998) como um fato que afeta negativamente a avaliação e entendimento da diversidade Neotropical, bem como dos fatores que determinam a composição da ictiofauna desta região.

1.2 Citotaxonomia de *Eigenmannia*.

Os peixes pertencentes à ordem Gymnotiformes constituem um grupo endêmico de água doce da região Neotropical (Albert and Crampton 2005). Uma das principais características dos representantes desta ordem é a emissão contínua de descargas

elétricas de baixa voltagem, relacionada ao hábito noturno da maioria das espécies e utilizada como método de eletro-localização e eletro-comunicação (Alves-Gomes 2001) Tal característica confere a estes peixes o nome popular de "peixes-elétricos".

Entre os peixes identificados na ordem Gymnotiformes estão relacionadas cerca de 100 espécies componentes de 27 gêneros e agrupadas em cinco famílias, Aptenorotidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae, segundo Mago-Leccia (1994). Nesta última família está inserido o gênero *Eigenmannia*, que apresenta oito espécies nominais, identificadas como *E. virescens*, *E. limbata*, *E. macrops*, *E. microstoma*, *E. nigra*, *E. trilineata*, *E. humboldtii* e *E. vincentespelaea*, além de inúmeras formas e morfotipos que são encontrados na sua área de ocorrência. Estas espécies possuem data de divergência estimada em 16 milhões de anos e estão amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas brasileiras (Alberts 2001). No entanto, a diversidade de espécies deste grupo não é bem estabelecida e denota a necessidade de uma extensa revisão taxonômica do gênero, uma vez que as espécies já descritas provavelmente constituem grupos de espécies crípticas morfologicamente identificadas (Moysés et al. 2010).

Os estudos citogenéticos neste grupo restringem-se principalmente a algumas espécies/citótipos de *Eigenmannia*, como *E. virescens*, *E. trilineata*, *Eigenmannia* sp, *Eigenmannia* sp1 e *Eigenmannia* sp2. As espécies analisadas até o momento apresentam macroestrutura cariotípica variável, com números diplóides que vão de 28 a 40 cromossomos (Arai 2011). Além disso, fazem parte deste grupo de organismos espécies e citótipos que apresentam diferentes sistemas de heteromorfismos cromossômicos que têm sido identificados como sistemas de cromossomos sexuais, sendo identificados desde sistemas simples como XX/XY e ZZ/ZW em *E. virescens* e sistemas múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *Eigenmannia* sp2 e até mesmo

espécies ou citótipos sem cromossomos sexuais heteromórficos (Almeida-Toledo et al. 1984; Almeida-Toledo et al. 2000; Almeida-Toledo et al. 2001; Silva et al. 2009; Moysés et al. 2010). Uma análise filogenética recente destes citótipos revelou a presença de um padrão de labilidade dos sistemas de determinação sexual e uma maior conservação do número cromossômico (Moysés, 2005), indicando que os cromossomos sexuais em *Eigenmannia* seriam sistemas com formação recente e que possivelmente tiveram origem múltipla e independente (Henning et al. 2011).

Considerando as características biológicas deste grupo de peixes, torna-se relevante estender os estudos citogenéticos às demais espécies do gênero tanto quanto possível, com a utilização de análises citogenéticas clássicas (Giemsa, Bandamento-C, AgNO₃), análises citogenéticas moleculares envolvendo células mitóticas (FISH) e análises meióticas baseadas na aplicação de protocolos de técnicas de imunodeteção envolvendo diversas proteínas relacionadas com a dinâmica, estrutura e função dos cromossomos durante a meiose. Tais investigações visam construir um conjunto robusto de evidências que sustentem e respondam a questões sobre a origem da variabilidade cariotípica e permitam uma melhor compreensão dos caminhos evolutivos percorridos pelos componentes deste grupo de peixes, com especial atenção à estrutura dos cromossomos do complemento cariotípico normal e dos processos envolvidos na formação e diferenciação dos cromossomos sexuais.

2. Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar citogeneticamente espécies de peixes do gênero *Eigenmannia* de ocorrência em componentes das bacias hidrográficas da Amazônia, do Rio da Prata e do Rio São Francisco, a fim de aprofundar o conhecimento dos processos envolvidos na evolução cariotípica deste gênero, com ênfase particular na evolução dos sistemas de cromossomos sexuais, através de uma análise comparativa realizada nos cromossomos mitóticos pela aplicação de protocolos de técnicas de citogenética clássica como Bandamento C e coloração por AgNO₃, bem como de citogenética molecular, com a aplicação de técnicas de FISH utilizando como marcadores sondas de DNA ribossômico 5S e 18S, sequências histônicas e sequências U2 DNAsn, e nos cromossomos meióticos, com a análise da dinâmica dos cromossomos sexuais nas células germinativas utilizando técnicas de imunodeteção nas espécies e nos citótipos com cromossomos sexuais heteromórficos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material biológico

No presente trabalho foram analisadas seis espécies e citótipos de *Eigenmannia* de ocorrência em sete localidades pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 1). De cada indivíduo analisado foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos mitóticos, as gônadas para análises de cromossomos meióticos e fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e, após identificação, foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foi utilizado o método de estimulação de mitoses, conforme referido por Cole e Levans (1971), seguido da aplicação do protocolo de obtenção de preparação direta de cromossomos mitóticos utilizado por Foresti et al. (1993), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972). Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH de acordo com Pinkel *et al.* (1986), para a localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e 18S, snDNA U2 e de DNAhis H3 e H4.

Tabela 1: Exemplares de peixes do gênero *Eigenmannia* analisados

Espécie	Localidade	Coordenada	Bacia hidrográfica
<i>Eigenmannia virescens</i>	Araras-SP	22° 22'S 47° 25'O	alto Paraná
<i>Eigenmannia microstoma</i>	Franc. Dumont-MG	17°19'S, 44° 17'O	São Francisco
<i>Eigenmannia limbata</i>	Rio Branco- AC	10° 2'S, 67° 51'O	Amazonas
<i>Eigenmannia</i> aff. <i>trilineata</i>	Corumbá-MS	19°34'S, 57°01'O	Paraguai
<i>Eigenmannia</i> sp1	Araras-SP	22°22'S,47°25'O	alto Paraná
	Mun. Colômbia-SP	20°09'S,48°37'O	
<i>Eigenmannia</i> sp2	Bauru-SP	22°20'S, 48°53'O	alto Paraná

3.2.1 Estimulação de mitoses

Para obtenção de maior número de células em mitose foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por meio da inoculação intramuscular de suspensão de células de fermento biológico, conforme técnica descrita por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada para peixes por Bertollo et al. (1978) e apresentada por Oliveira et al. (1988). O procedimento utilizado consistiu em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na proporção de 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa a 37°C por cerca de 10 minutos;
- 3) injetar a solução na região dorso-lateral do peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado por cerca de 48 horas, antes de sacrificar o animal e proceder à coleta de amostra de tecidos.

Fragmentos de tecidos de rim e brânquias foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas visando ao estudo cariotípico das espécies.

3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos seguiu o protocolo descrito por Foresti et al. (1993), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve, basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos do fuso mitótico pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão *in vitro*, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol e ácido acético. O procedimento consiste em:

- 1) anestésiar o animal em solução de benzocaína a 0,01%;
- 2) sacrificar o animal, retirando fragmentos de tecido da porção anterior do rim.
Transferir o material para uma pequena placa de Petri de vidro contendo 10ml de meio de cultura RPMI previamente aquecido em estufa a 37 °C;
- 3) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com a sucção em pipeta Pasteur até obter uma suspensão homogênea;
- 4) adicionar 2 gotas de colchicina a 0,01% com uma seringa de 1ml e levar à estufa a 37°C por 30 minutos;
- 5) centrifugar a suspensão celular por 10 minutos a 1000rpm e descartar o sobrenadante;
- 6) acrescentar 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C e levar à estufa a 37C ° por 21 minutos;

- 7) retirar da estufa, colocar 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 8) adicionar cerca de 10ml de fixador e novamente agitar a mistura com pipeta Pasteur e levar à centrífuga por 10 minutos a 1000rpm;
- 9) pingar 1 a 2 gotas do material em lâminas histológicas;
- 10) deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para a aplicação de diferentes técnicas de bandamento cromossômico.

3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) pela impregnação com nitrato de Prata (AgNO_3)

Essa técnica caracteriza-se pela reação química da prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo de proteínas nas Regiões Organizadoras de Nucléolo nos cromossomos. O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO_3 dissolvida em 2ml de água destilada. Depois de preparadas, essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4°C.

O procedimento para a coloração das RONs foi o seguinte:

- 1) hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60°C;

- 2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3) deixar as lâminas sobre um suporte, em banho-maria a 60°C. Em alguns minutos a mistura das soluções adquire coloração marrom dourada. Lavar, então, a lâmina em água destilada e deixar secar;
- 4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos;
- 5) deixar secar ao ar.

3.2.4 Identificação da heterocromatina constitutiva

Essa técnica caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina sobre a preparação para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas. O procedimento foi seguido conforme protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas adaptações e consistiu em:

- 1) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2M por 25 minutos à temperatura ambiente;
- 2) lavar em água destilada à temperatura ambiente;
- 3) incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60°C por 5 a 15 segundos;
- 4) lavar rapidamente em HCl 1M, a 60°C por alguns segundos;
- 5) incubar a lâmina em 2XSSC, a 60°C por 25 minutos;
- 6) lavar com água destilada à temperatura ambiente;
- 7) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

3.2.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado ou músculo preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) conforme instruções do fabricante.

3.2.6 Preparação das sondas de DNA para FISH

3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida pela aplicação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Eigenmannia microstoma*, usando os *primers* 18S F (5'CCG CTT TGG TGACTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3') (White *et al.*, 1990). Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) (Roche Applied Science). Os parâmetros utilizados para a marcação foram: 31ml de água Mili-Q, 5ml de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5ml de MgCl₂ (25mM), 1ml de dATP, dCTP e dGTP e 0,7ml de dTTP (2mM cada), 0,8ml de Digoxigenina-11-dUTP, 1ml de cada *primer* (10mM), 0,5ml de Taq polimerase (5U/μL) e 2ml de DNA molde, com um total da reação de 50ml.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

94°C ---- 2 min	}	30x
95°C ---- 45 seg		
52,1°C ---- 45 seg		
72°C ---- 1 min e 30 seg		
72°C ---- 5 min		
12°C ---- manutenção		

A sonda de DNAr 5S foi obtida pela aplicação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Eigenmannia virescens*, usando os *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCTCGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás *et al.*,1994b). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros utilizados para a marcação foram: 33ml de água Mili-Q, 2 ml de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5ml de MgCl₂ (25mM), 1ml de dATP, dCTP e dGTP e 0,5ml de dTTP (2mM cada), 2ml de Biotina-16-dUTP, 1 ml de cada primer (10mM), 0,5ml de Taq polimerase (5U/μL) e 2ml de DNA molde, com um total da reação de 50ml.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95°C ---- 5 min	}	30x
95°C ---- 1 min		
55°C ---- 45 seg		
72°C ---- 1 min		
72°C ---- 7 min		
12°C ---- manutenção		

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.6.2 Preparação das sondas de DNAhis H3

A sonda de DNAhis H3 foi obtida pela aplicação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Eigenmannia aff trilineata*, usando os *primers* H3 F (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3') e H3 R (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC-3') (Colgan et al., 1998). As sondas foram marcadas com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Os parâmetros utilizados para a marcação foram: 33ml de água Mili-Q, 2ml de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5ml de MgCl₂ (25mM), 1ml de dATP, dCTP e dGTP e 0,5ml de dTTP (2mM cada), 2ml de Biotina-16-dUTP, 1ml de cada primer (10mM), 0,5ml de Taq polimerase (5U/μL) e 2 ml de DNA molde, com um total da reação de 50ml.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95°C ---- 5 min	}	30x
95°C ---- 20 seg		
58 °C ---- 20 seg		
72°C ---- 30 seg		
72°C ---- 5 min		
12°C ---- manutenção		

3.2.6.3 Preparação da sonda para snDNA U2

A sonda utilizada para a detecção de sequências snDNA U2 foi obtida pela aplicação da técnica de PCR a partir de DNA total de *Eigenmannia microstoma*, usando os *primers* U2F (5-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-3) e U2R (5- TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-3) (Bueno et al. 2013). Esta sonda foi marcada com Biotina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando o sistema Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) (Roche Applied Science) Os parâmetros para a marcação foram: 33ml de água Mili-Q, 2ml de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5ml de MgCl₂ (25mM), 1ml de dATP, dCTP e dGTP e 0,5ml de dTTP (2mM cada), 2ml de Biotina-16-dUTP, 1ml de cada primer (10mM), 0,5ml de Taq polimerase (5U/μL) e 2ml de DNA molde, com um total da reação de 50ml.

3.2.7 Hibridação *in situ* fluorescente

O mapeamento das sondas compostas por DNA repetitivo em cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de FISH, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada

banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37°C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos.

Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM por 10 minutos a 37°C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 C por 5 minutos em cada banho. Após a secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70% a 70°C por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida, 2xSSC e água) contendo 3-6 µL de sonda marcada por 10 minutos a 100°C. Posteriormente, 15mL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37°C *overnight*.

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos.

Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50µL de solução de bloqueio (leite em pó, 4xSSC e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30µL de solução de bloqueio com anticorpo (24µL de solução de bloqueio, 3µL de antidigoxi- rodamina

e 3 μ L de avidina-FITC) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C, sendo em seguida lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 μ L de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.3 Estudos cariotípicos

Tanto as preparações cromossômicas processadas com as técnicas convencionais como por técnicas moleculares como pela hibridação *in situ* fluorescente foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diploide modal da espécie, com a contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime pertencente a cada espécie ou população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases analisadas tanto por coloração convencional quanto por fluorescência foram capturadas com software Image Pro Plus 6.0 (MediaCybernetics), sendo as preparações tratadas por fluorocromos capturadas separadamente utilizando filtros UV específicos coloridos e sobrepostos no mesmo software.

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop 11.0 (Adobe System) e organizados em pares de homólogos em classes e em ordem decrescente de tamanho para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan et al. (1964).

3.4 Cromossomos meióticos

3.4.1 Obtenção de cromossomos meióticos

Para a obtenção dos cromossomos meióticos na fase de paquíteno foi utilizada a metodologia descrita por (Araya-Jaime et al. 2014), que brevemente consta de:

- 1) sacrificar os indivíduos com uma *overdose* de benzocaína;
- 2) remover as gônadas (testículos ou ovários) e imergi-los em 200µl de solução de Hank (Sigma) gelada em uma placa de Petri. O volume de solução salina deve representar três vezes o volume de tecido;
- 3) dissociar o tecido com o auxílio de pinças para obter uma suspensão celular fina;
- 4) transferir a suspensão de células para um tubo de 1,5ml e decantar por 30 min;
- 5) colocar uma gota da suspensão de células (aproximadamente 20µl) no centro de uma lâmina de vidro limpa e seca, evitando-se a presença de detritos celulares;
- 7) adicionar 2 gotas de sacarose 0,2 M e 2 gotas de Triton X-100 0,2% nas células. Todas as solução devem ser ajustadas a um pH 8,5 com tetraborato de Sódio 0,1 M;
- 8) incubar as preparações contendo as suspensões celulares de testículos (4 min) e de ovários (7 min) a 37°C;
- 9) fixar as células na lâminas adicionando 10 gotas de solução de paraformaldeído 4% em pH 8.5, ajustado com tetraborato de Sódio 0,1 M por 15min;
- 10) remover o excesso de líquido com papel absorvente e deixar secar à temperatura ambiente por 3 horas;
- 11) lavar as lâminas 3 vezes com solução Photo-Flo 200 a 0,08% (Kodak) e secar em posição vertical;
- 12) avaliar a qualidade das preparações corando com nitrato de Prata de acordo com o protocolo descrito por (Howell and Black 1980);

13) armazenar as preparações a -20°C no freezer.

3.4.2 Imunodeteção de proteínas do complexo sinaptonêmico (SYCP3), de regiões inativas da cromatina (H3K9me) e de regiões não sinaptadas (γH2AX)

Nas preparações de espalhamentos meióticos, as proteínas do elemento lateral do complexo sinaptonêmico (SYCP3), de resíduos da histona H3 metilada na lisina 9 (H3K9me) e a variante da Histona H2AX fosforilada da serina 139 (γH2AX), foram identificadas pela aplicação da técnica de imunodeteção (Tabela 2), seguindo o protocolo descrito por Araya-Jaime et al. (2015)^(Jaime et al. 2015), conforme descrito abaixo:

- 1) lavar as lâminas três vezes em PBS 1x por 5 min; não deixar as lâminas secarem;
- 2) executar a recuperação antigênica*, imergindo as lâminas em tampão citrato 0,01 M (pH 6) pré-aquecido a 95°C por 20 min;
- 3) deixar esfriar à temperatura ambiente por 20 min;
- 4) lavar três vezes em PBS 1x por 2 min por vez;
- 5) incubar com anticorpo primário (1/100 em PBS 1x) adicionando $25\mu\text{l}$ por lâmina e cobrir com lamínula, deixando por 1:30 horas a 37°C em câmara úmida;
- 6) lavar três vezes em PBS 1x por 5 min por vez à temperatura ambiente;
- 7) incubar com anticorpo secundário (1/100 em PBS 1x), adicionando $25\mu\text{l}$ por lâmina e cobrir com lamínula por 40 min a 37°C .
- 8) lavar três vezes em PBS 1x, por 5 min. por vez;
- 9) montar as preparações sob as lamínulas com $15\mu\text{L}$ de Vectashield/DAPI.

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados.

Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Proteína Diana
Anti-SYCP3(medaka) em Guinea Pig (Iwai et al. 2006)	Anti Guinea Pig-FITC	Reconhece elemento lateral do complexo sinaptonêmico
Anti H3K9 monometilada (Ab 9045)	Anti Mouse-Texas Red	Reconhece regiões silenciadas da cromatina
Anti γH2AX (Ab 131382)	Anti Rabbit-Texas Red	Em cromossomos paquitênicos, reconhece porções não pareadas nos bivalentes.

3.5 Análise molecular (DNA barcoding)

O DNA total foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado, brânquias ou músculos, utilizando “kits” para extração de DNA total da empresa Qiagen (Dneasy Blood & Tissue kit). As amostras foram preservadas em tampão TAE até o processamento do material para amplificação. Os segmentos do gene Citocromo Oxidase subunidade I foram amplificados com os *primers* Fish F1e Fish R1, descritos por Ward et al. (2005). A amplificação foi efetuada num ciclador térmico de PCR utilizando-se 25 μ l de uma solução contendo 16,1 μ l de água destilada, 2,5 μ l de dNTP (8mM), 2,5 μ l de tampão 10X, 1,2 μ l de cada primer (10 μ M) e 0,5 μ l 20 de DNA Polimerase (5 s/ μ l). Cada ciclo de PCR consistiu, basicamente, da desnaturação do DNA por 5 minutos a 95°C, hibridação por 45 segundos a 52°C e extensão por 1 minuto a 68°C. Este ciclo foi repetido 30 vezes e o passo final incluiu uma extensão final por 5 minutos a 68°C.

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8%, sendo que o DNA amplificado foi purificado com ExoSap-IT (USB Corporation) e sequenciado com a utilização do kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems). O DNA foi sequenciado num sequenciador automático modelo 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems), disponível no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência, UNESP, campus de Botucatu.

Foram obtidas sequências consenso a partir das sequências *forward* e *reverse* de cada amostra utilizando o programa Geneious 4.8 (Kearse *et al.*, 2012). Estas sequências foram alinhadas usando-se o programa editor MuscleClustalX (Edgar, 2004) acoplado ao Geneious 4.8. Para estudo das sequências foram obtidas as distâncias genéticas *pairwise* intra e intergrupos utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980), através do programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). O nível de confiança da configuração dos ramos obtidos no agrupamento foi avaliado usando o método de *bootstrap* (1000 repetições).

Para a delimitação das espécies e identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomy Unit - OTU) foi utilizado o programa General Mixed Yule Coalescent Model (GMYC) com o modo Birth/Death, que considera tanto a probabilidade de especiação quanto de extinção. O GMYC é um programa que busca determinar o ponto de transição dos processos evolutivos que ocorrem em nível de espécie (especiação e extinção) e aqueles que ocorrem em nível populacional (coalescência) (Pons *et al.*, 2006).

Uma vez que uma das premissas do GMYC é de que não haja politomias, foi utilizada a ferramenta *online* ElimDupes para a busca e remoção dos haplótipos repetidos. Posteriormente, foi realizada a construção de uma árvore ultramétrica com

relógio molecular relaxado utilizando um modelo de distribuição de tempo log-normal, pela aplicação dos programas BEAUTi e BEAST (Drummond, 2012). O modelo evolutivo de nucleotídeos utilizado para estimar a árvore ultramétrica foi o de HKY com correção Gama, sendo que foram amostradas 30.000.000 de árvores a cada 1.000 gerações. Os dados foram checados através do programa TRACER v.1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) a fim de avaliar a necessidade de corridas extras para alcançar a convergência. Todas as topologias amostradas abaixo da assíntota (3.000 gerações) foram descartadas como parte de um procedimento de *burn-in*. As informações restantes foram utilizadas para construir uma árvore consenso por maioria com a utilização do programa TreeAnnotator. Os clusters foram, então, identificados com a aplicação do programa GMYC utilizando os pacotes APE e SPLITS no programa R-studio (2012), sendo que o método utilizado foi o de limiar único com parâmetros padrão.

4. Resultados e Discussão

As informações obtidas nos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em amostras de espécies de peixes do gênero *Eigenmannia* foram organizadas na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir.

4.1 Capítulo 1 - Análise cariotípica e mapeamento cromossômico de 5 classes de DNAs repetitivos no gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes: Sternopygidae): Inferências sobre a organização do genoma.

4.2 Capítulo 2 - *Eigenmannia* sp2 X_1X_2Y : Sistema múltiplo de cromossomos sexuais ou caráter ligado ao sexo? Novas evidências citogenéticas sobre a formação do cromossomo Y.

4.3 Capítulo 3 - Delimitação de espécies utilizando DNA barcode e análises citogenéticas em representantes de *Eigenmannia*.

Capítulo 1

Análise cariotípica e mapeamento cromossômico de 5 classes de DNA repetitivo no gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes: Sternopygidae): Inferências na organização do genoma.

Resumo

Eigenmannia Jordan & Evermann (1896) é um gênero de peixe elétrico endêmico da região Neotropical. Atualmente são reconhecidas oito espécies que podem ser subdivididos em dois grupos principais. Estudos citogenéticos neste gênero indicam a ocorrência de variação da macroestrutura cariotípica, descrevendo-se cariótipos com 24 até 40 cromossomos. Aqui, nós relatamos os locais cromossômicos das cinco classes de DNAs repetitivos reveladas por hibridação in situ fluorescente (5S -18S DNAr, histonas H3/H4 e RNAsn U2) em seis espécies/citótipos do gênero *Eigenmannia*, *E. microstoma*, *E. limbata* e *E. virescens*, *E. aff trilineata*, *Eigenmannia* sp1 e *Eigenmannia* sp2 todos de ocorrências nas principais bacias do Brasil. Para as seis espécies/citótipos, o 18S DNAr foi localizado em um único par de cromossomos em todas as espécies, enquanto os sítios de DNAr 5S foram encontrados preferentemente na região pericentromérica dos cromossomos portadores e distribuídos de uma maneira particular em cada espécie. RNAsn U2 segue um padrão semelhante ao exibido pela distribuição 5s rDNA, apresentando blocos em cromossomos específicos de cada espécie. A localização das histonas H3 / H4 foi amplamente dispersos ao longo do genoma de seis espécies. Pouco se sabe sobre a estrutura e organização dos genomas gymnotiformes conhecimento da distribuição cromossômica de sequências de DNA repetitivas em *Eigenmannia* representa o primeiro passo para alcançar uma visão integrada de seus genomas.

Introdução

Uma grande parte do genoma eucarioto é composto de sequências de DNAs repetitivos, incluindo famílias multigênicas, satélites, microssatélites e elementos transponíveis (Jurka et al. 2005) e sua natureza repetitiva as caracteriza como bons marcadores para mapeamento físico dos cromossômico, possibilitando um melhor conhecimento sobre a estrutura do genoma e sua organização (Da Silva et al. 2013). O mapeamento físico destas sequências repetitivas também tem sido aplicado nos estudos sobre a biodiversidade e evolução da ictiofauna, revelando aspectos sobre a composição da cromatina e a ocorrência de rearranjos cromossômicos, entre outros eventos que podem esclarecer questões relacionadas ao processo de diferenciação das espécies (Ferreira et al. 2010).

Apesar de serem considerados importantes e úteis marcadores cromossômicos, os dados atualmente disponíveis com a utilização de sondas de DNA repetitivo ainda são pouco representativos em peixes, restringindo-se mais à localização de genes de RNAs ribossomais 18S e 5S (Vicari et al. 2010; Blanco et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013; de Silva et al. 2014). Entretanto, os dados acerca de outros tipos de DNA repetitivo, como por exemplo, histonas e elementos transponíveis tem aumentado nos últimos anos (Hashimoto et al. 2011; Hashimoto et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013; de Silva et al. 2014). Os RNAs nucleares pequenos (RNAsn) estão associados a um complexo de pequenas ribonucleoproteínas (RNPsn) (Manchado et al. 2006), fazendo parte de uma família multigênica de RNAs não codificantes que compõe o spliceossomo, sendo eles: U1, U2, U4, U5 e U6. Estes RNAsn são altamente conservados e desempenham um papel crucial no processo de splicing (Valadkhan 2005); contudo, os estudos de mapeamento físico destes genes nos cromossomos de

peixes ainda são poucos e se restringem à utilização da sonda de DNAsn U2 (Merlo et al. 2010; Ubeda-Manzanaro et al. 2010a; Supiwong et al. 2013).

Notavelmente, a distribuição de DNA repetitivos no genoma de espécies de *Gymnotus* Linnaeus, 1758, outro gênero pertencente a Gymnotiformes, é bem conhecido e mostrou que as famílias individuais multigênicas podem ser extremamente variáveis, como no caso de DNAr 5S ou conservado como nos casos de U2 snDNA e 18S DNAr ao nível de espécie (Scacchetti et al. 2011; Scacchetti et al. 2012; Milhomem et al. 2013; Utsunomia et al. 2014). Portanto, o mapeamento citogenético pode ser uma ferramenta valiosa para fornecer informações sobre as relações evolutivas entre espécies próximas e permitir uma melhor compreensão da distribuição e organização de sequências repetitivas no genoma de diversas espécies.

Eigenmannia Jordan & Evermann (1896) é um gênero de peixes elétricos da família Sternopygidae (Gymnotiformes) que está amplamente distribuído pelas principais bacias hidrográficas da região Neotropical, como nos rios Madalena, Orinoco, Amazonas e Paraná (Mago-Leccia 1978; Alves-Gomes et al. 1995; Alberts 2001). Este gênero é constituído atualmente por oito espécies, que podem ser distribuídas nos grupos *microstoma* e *virescens* (Mago-Leccia 1994; Albert 2001). As espécies componentes do grupo *microstoma* apresentam corpo grande e coloração escura na maturidade sexual, tais como *E. microstoma*, *E. humboldtii*, *E. limbata* e *E. nigra*, enquanto as espécies componentes do grupo *virescens* apresentam duas ou três linhas longitudinais ao longo do corpo na maturidade sexual, tais como *E. virescens*, *E. trilineata* e *E. vicentespelaea* (Silva et al. 2009). A posição de *Eigenmannia macrops* nestes grupos ainda é indefinida, segundo Bichuette & Trajano (2006). No entanto, apesar desta classificação, *Eigenmannia* ainda é considerado um gênero taxonomicamente confuso, pois a falta relativa de variação morfológica entre as

espécies faz com que seja difícil definir caracteres diagnósticos (Mago-Leccia 1994; Albert 2001).

Estudos citogenéticos foram realizados neste grupo nos últimos anos a partir de amostras obtidas de diferentes espécies e populações de *Eigenmannia* de ocorrência nos componentes das bacias hidrográficas brasileiras. O número diplóide encontrado nas amostras analisadas variaram de $2n=28$ em *Eigenmannia* sp.1 a $2n=46$ em *Eigenmannia* sp (Arai 2011). Além desta importante variação no número diploide dentro do gênero, estes estudos destacam a presença de vários tipos de heteromorfismos cromossômicos que identificam sistemas de cromossomos sexuais. Em *E. virescens* foram descritas populações com sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e XX/XY (Almeida-Toledo et al. 2001a; Almeida-Toledo et al. 2002), enquanto *Eigenmannia* sp2 apresenta um sistema múltiplo, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, (Almeida-Toledo et al. 1984; Almeida-Toledo et al. 2000).

Portanto, o mapeamento físico de marcadores de DNA repetitivo pode ser uma ferramenta valiosa para fornecer informações sobre as relações evolutivas entre espécies próximas, permitir uma melhor compreensão da distribuição e organização destas sequências no genoma e fazer inferências sobre o papel que este tipo de sequência pode ter na diferenciação de cariótipos e diversificação deste grupo de peixes.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é estudar a estrutura cromossômica de 6 representantes do gênero *Eigenmannia* provenientes das principais bacias hidrográficas do Brasil, bem como constituição a distribuição de 4 classes de DNA repetitivo no genoma destas espécies. Com a aplicação da técnica de FISH serão mapeadas sequências para DNAr 5S e 18S, sequências dos genes para as histonas H3 e H4 e para U2 RNAs, visando aprofundar o conhecimento sobre a organização genômica

dos DNAs repetitivos, bem como avaliar sua participação nos processos determinantes da evolução cariotípica neste gênero.

Material e métodos

Amostras analisadas

No presente trabalho foram analisadas seis espécies e citótipos de peixes componentes do gênero *Eigenmannia*, coletadas em ambiente natural em cinco localidades representantes de componentes de bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 1). Os exemplares foram identificados e após análise, fixados em formalina 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Preparações cromossômicas e bandamentos

Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína e sacrificados para a retirada de amostras de tecidos para análise citogenética. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal com base no protocolo referido em (Foresti and de Almeida-Toledo 1993) e para a identificação das RONS ativas foi utilizado o protocolo estabelecido por (Howell and Black 1980). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por (Levan et al. 1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Obtenção e marcação das sondas de DNA repetitivo

A extração e purificação de DNA foram realizadas com a utilização do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo o protocolo do produto. As sequências para DNAr 5S e 18S, DNA das histonas H3 e H4 e do RNAsn U2 foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico de representantes do gênero *Eigenmannia* utilizando *primers* já descritos (White et al. 1990; Pendas et al. 1994; Colgan et al. 1998; Pineau et al. 2005; Ubeda-Manzanaro et al. 2010b). As reações foram realizadas para um volume final de 25ul, utilizando 200uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 1X de Taq DNA buffer (20mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50mM KCl); 0,5U de Taq polimerase (Life Technologies); 0,1uM de cada primer e 50ng de DNA genômico.

A marcação das sondas correspondente às sequências de DNA repetitivo foi realizada pela aplicação de reações de PCR incluindo o nucleotídeo modificado digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science), para marcar as sequências de DNAr 18S, DNAsn U2 e DNAhis H4 e da biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) para marcar o DNAr 5S e DNAhis H3.

Hibridação in situ Fluorescente (FISH)

Nos experimentos de FISH os cromossomos foram tratados de acordo com os procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986), utilizando stringência de 77%. As sondas marcadas com biotina-16-dUTP tiveram seus sinais detectados utilizando avidina-FITC (Roche Applied Science) e as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP tiveram seus sinais detectados com antidigoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e suas imagens foram capturadas por meio de câmera digital (Olympus DP70) acoplada a um

fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX61). A montagem dos cariótipos e a padronização de brilho e contraste foram realizadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS4.

Resultados

Análise da macroestrutura cariotípica.

A análise citogenética realizada em representantes de seis espécies e citótipos de *Eigenmannia* evidenciou uma variação expressiva no número diploide entre as espécies. Apesar do estado conservado com relação ao número de cromossomos nos representantes das espécies *E. limbata*, *E. microstoma*, *E. virescens*, todas com cariótipos compostos por 38 cromossomos, a morfologia cariotípica diferencial permite identificar cada espécie (Fig1A-1C). *Eigenmannia* sp.1 apresentou 28 cromossomos (Figura 1D), enquanto que para os espécimes analisados de *Eigenmannia* sp.2 os números diploides foram de $2n=32$ para as fêmeas e $2n=31$ para os machos (Figuras 1E e 1F), caracterizando um sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ descrito por Almeida-Toledo et al. (1984). Finalmente, nos representante de *Eigenmannia* aff. *trilineata* o número diplóide de cromossomos apresentou um polimorfismo numérico entre machos e fêmeas, sendo que nesta espécie os machos possuem cariótipos formados por 32 cromossomos enquanto as fêmeas possuem cariótipos com 31 cromossomos. Esse polimorfismo pode ser o primeiro caso no gênero *Eigenmannia* relatando um sistema de cromossomos sexuais hemigaméticos do tipo ZZ/Z0 (Figuras 1G e 1H).

A técnica de bandamento C revelou diferenças significativas nos padrões de distribuição da heterocromatina entre as espécies analisadas. Nas espécies *E. limbata*, *E. virescens* e *Eigenmannia* sp.2 foram observadas pequenos blocos de heterocromatina constitutiva restritos à região pericentromérica de todos os cromossomos, enquanto que em *Eigenmannia* sp.1, *E. microstoma* e *E. aff. trilineata*, além das marcas pericentroméricas, alguns cromossomos também apresentaram blocos intersticiais conspícuos de heterocromatina (Figura 2).

Mapeamento com sondas de DNA repetitivo

O mapeamento das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) pela aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda de DNAr 18S revelou marcações fluorescentes em um único par cromossômico em todas as espécies analisadas, porém com variação na sua localização. Assim, as marcações foram localizadas no par 10 em *E. limbata* (Figura 3A), no par 14 em *E. microstoma* (Figura 3B), no par 13 em *E. virescens* (Figura 3C), no par 3 em *Eigenmannia* sp.1 (Figura 3D), no par 10 para *Eigenmannia* sp.2 (Figuras 3E e 3F) e no par 11 em *E. aff. trilineata* (Figura 3G e 3H),

O DNAr 5S apresentou resultados diversos, mostrando uma variação significativa no número sequências marcadas e na localização dos *clusters*. Estes sítios foram detectados em um par cromossômico em *Eigenmannia* sp.2 (Figuras 3E e 3F); em dois pares em *E. limbata* (Figura 3A); em 4 pares em *Eigenmannia* sp.1 (Figura 3D); em 5 pares em *E. virescens* e *E. aff. trilineata* (Figuras 3C e 3G-H) e em 10 pares em *E. microstoma* (Figura 3B).

A distribuição dos *clusters* do gene U2 mostrou-se variável quanto ao número de sítios, localização cromossômica e em número de sítios sintênicos com DNAr 5S entre as espécies. Os sítios para DNAsn U2 foram localizados nos pares 11 e 12 em *E.*

limbata (Figura 4A); nos pares 12, 16 e 17 em *E. microstoma* (Figura 4B); nos pares 10, 11, 12, 14, 15, 16 e 17 em *E. virescens* (Figura 4C); na região pericentromérica de todos os cromossomos acrocêntricos em *Eigenmannia* sp.1 (Figura 4D); na região pericentromérica dos cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e no par 12 em *Eigenmannia* sp.2 (Figuras 4E e 4F); e apenas no par 12 em *E. aff. trilineata* (Figuras 4G e 4H), enquanto os sinais para DNAr 5S se apresentaram colocalizados no par 14 em *E. limbata* (Figura 4A); nos pares 16 e 17 em *E. microstoma* (Figura 4B); nos pares 10, 11, 12, 14 e 15 em *E. virescens* ((Figura 4C); nos pares 11 e 14 em *Eigemnnania* sp.1 (Figura 4D); e no par 12 em *Eigenmannia* sp.2 e *E. aff trilineata* (Figuras 4E-4H). Nas seis espécies e citótipos analisados, os sinais para DNAr H3 e H4 foram detectados colocalizados (Figura 5) e dispersos sobre todos os cromossomos, destacando o bloco conspícuo para estas sequências no braço curto do par 1 em *E. microstoma* (Figura 6).

Discussão

Diferenciação cromossômica em Eigenmannia

De todas as espécies analisadas no presente trabalho, apenas *Eigenmannia virescens*, *Eigenmannia* sp.2 e *Eigenmannia* sp.1 já tinham seu cariótipos conhecidos, enquanto *E. limbata*, *E. microstoma* e o citótipo ZZ/ZO de *E. aff. trilineata* foram analisadas citogeneticamente pela primeira vez, aumentando o número de espécies cariotipadas no gênero. As análises cariotípicas confirmaram a variabilidade da macroestrutura cromossômica para o gênero e já reportada anteriormente em vários trabalhos (Almeida-Toledo et al. 1984, 2002; Silva et al. 2009b; Moysés et al. 2010;

Henning et al. 2010; Sene et al. 2014). As novas espécies cariotipadas aportam com novas evidências sobre a grande variabilidade cromossômica do gênero e também sobre a maior frequência de cariótipos com 38 cromossomos dentro do gênero *Eigenmannia*, como revisado por (Arai 2011). Dentro desta grande variação nos números diplóides também se destaca a descrição de um novo sistema de cromossomos sexuais hemigaméticos do tipo ZZ/ZO em *E. aff. trilineata* do rio Miranda, bacia do Rio Paraguai. A ocorrência deste tipo de heteromorfismo cromossômico já foi descrita para algumas espécies de peixes Neotropicais, entre as quais *Potamotrygon* spp. (Valentim et al. 2013) e *Ancistrus* sp. (Alves et al. 2006), que apresentaram um sistema hemigamético do tipo XX/XO, tendo os indivíduos do sexo masculino como sexo heteromórfico. Já no caso de *E. aff. trilineata* relatado no presente trabalho, os indivíduos do sexo feminino se identificam com o heteromorfismo, tratando-se, pois de um caso de um sistema hemigamético feminino, identificado pela primeira vez em peixes. Desta maneira, considera-se que *Eigenmannia* se apresenta como um gênero que possui quase todos os sistemas de cromossomos sexuais representados e descritos entre suas espécies, o que reforça a hipótese da origem independente destes sistemas cromossômicos de determinação do sexo no gênero (Henning et al. 2008a, 2011).

O mapeamento citogenético de diferentes marcadores de DNA repetitivo evidenciou características distintas para cada sequência. Foi possível verificar que os sítios de DNA ribossomal se distribuem de forma variável nas distintas espécies analisadas. Assim, o DNAr 18S mostrou-se conservado em número de *clusters* presente nos cromossomos, com 2 *loci* por genoma, enquanto o DNAr 5S mostrou-se bastante diversificado, com variações de 2 a 10 sítios presentes por genoma. De fato, estudos anteriores evidenciaram a ocorrência de variações na distribuição de genes ribossomais, revelando que, possivelmente, estes sítios estejam associados a elementos transponíveis

em *Eigenmannia* (Sene et al. 2014). Por outro lado, a distribuição dos genes para RNAsn U2 apresentou uma variabilidade moderada, quando comparada com a distribuição cromossômica das sequências para DNAr 5S, variando de 1 a 7 pares os cromossomos portadores envolvidos por espécies. Os resultados obtidos para as espécies deste gênero não são consistentes com estudos prévios realizados em peixes (Utsunomia et al. 2014) e gafanhotos (Bueno et al. 2013; Palacios-Gimenez and Cabralde-Mello 2014), que mostram um estado conservado no número e posição destes sítios em espécies próximas. Adicionalmente, também foi observada a colocação de *clusters* de DNAsn U2 e DNAr 5S em todas as espécies e citótipos analisados, variando o número de cromossomos portadores de ambas as sequências, desde 1 par em *Eigenmannia* sp.2, *E. limbata* e *E. aff. trilineata* até 5 pares coincidentes em *E. virescens*. Estes resultados representam a primeira evidência de associação entre sequências de DNAsn U2 com DNAr em Gymnotiformes.

Considera-se, pois, que novas investigações são necessárias para determinar se este posicionamento conjunto de sequências gênicas ocorre de forma independente e aleatória neste grupo ou se estaria associada a fatores determinantes de possíveis vantagens seletivas, importantes no processo de especiação. Utilizando técnicas citogenéticas diversificadas foi possível descrever os cariótipos de diversas espécies de *Eigenmannia*, resultando no aumento do conhecimento sobre a distribuição genômica de diferentes tipos de sequências de DNA repetitivo e a diferenciação dos cromossomos sexuais, como no caso de *Eigenmannia* sp.2, em que se presume o envolvimento das sequências DNAsn U2 na formação do cromossomo Y. Os dados aqui obtidos permitem melhorar o conhecimento sobre a origem deste tipo particular de cromossomos encontrados neste grupo.

Tabela 1: Espécies de peixe do gênero *Eigemmannia* analisadas e locais de coleta.

Espécie	Localidade	Coordenada	Bacia
<i>Eigenmannia virescens</i>	Araras-SP	22°22'S, 47°25'O	alto Paraná
<i>Eigenmannia microstoma</i>	Francisco Dumont-MG	17°19'S, 44°17'O	São Francisco
<i>Eigenmannia</i> aff. <i>limbata</i>	Rio Branco- AC	10° 2'S, 67 ° 51'O	Amazonas
<i>Eigenmannia</i> aff. <i>trilineata</i>	Corumbá-MS	19°34'S, 57°01'O	Paraguai
<i>Eigenmannia</i> sp1	Mun. Colômbia-SP	22 °22'S, 47°25'O	alto Paraná
<i>Eigenmannia</i> sp2	Bauru-SP	22°20'S, 48°53'O	Alto Paraná

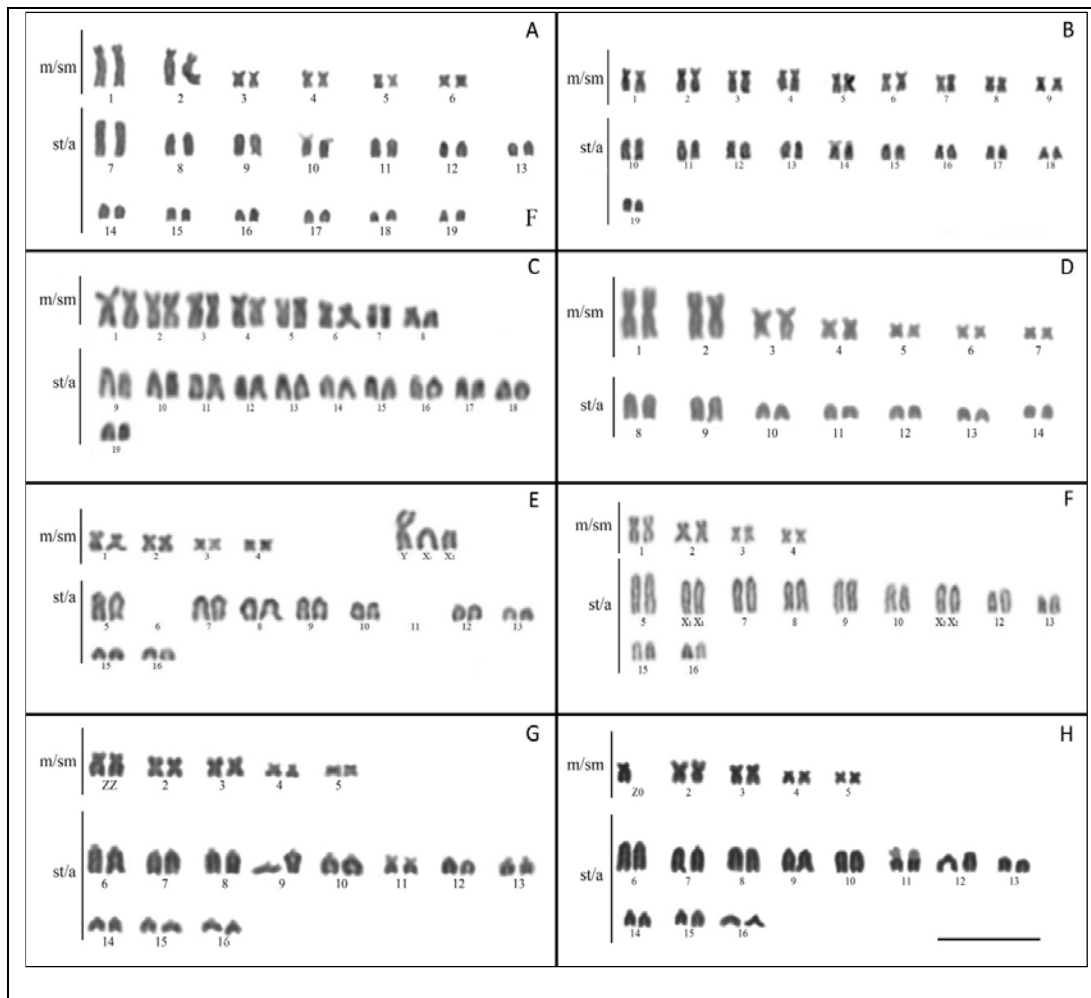


Figura 1: Cariótipos das espécies analisadas neste trabalho. Em A) *E. limbata*; B) *E. microstoma*; C) *E. virescens*; D) *Eigenmannia* sp1; E-F) Exemplos macho e fêmea de *Eigenmannia* sp2 e G-F) Exemplos macho e fêmea de *Eigenmannia* aff *trilineata*. A barra corresponde a 10 μ m.

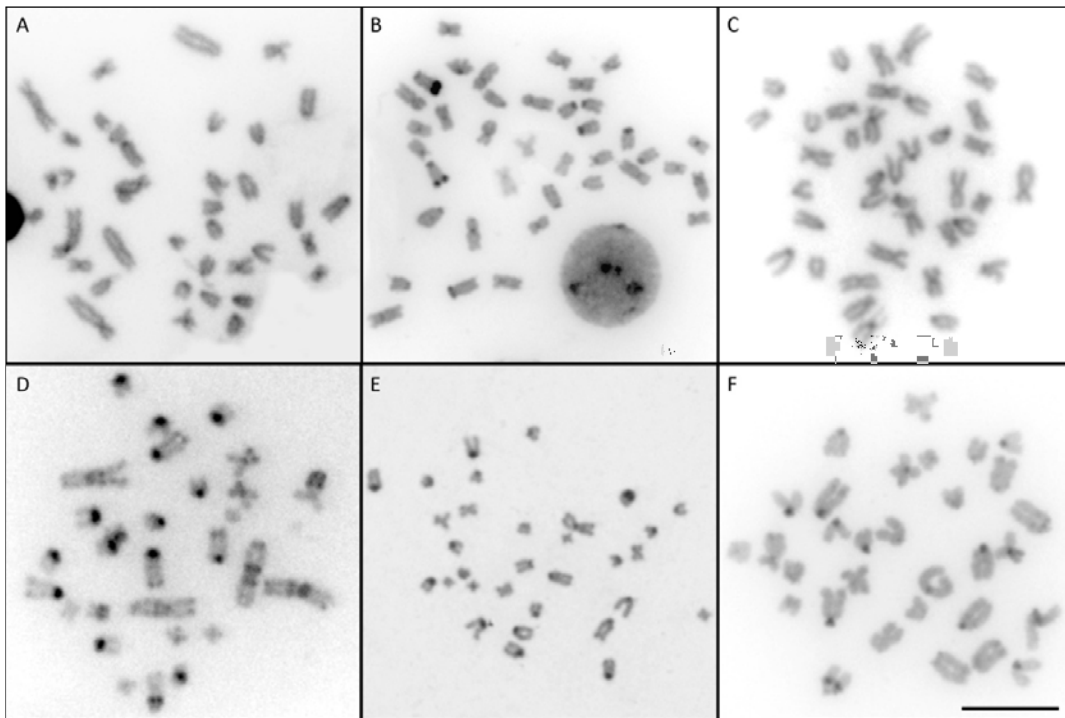


Figura 2: Distribuição cromossômica da heterocromatina constitutiva nas metáfases somáticas de *E. limbata* (A); *E. microstoma* (B); *E. virescens* (C); *Eigenmannia* sp1 (D); *Eigenmannia* sp2 (E) e *Eigenmannia* aff *trilineata*. A barra representa 10 μ m.

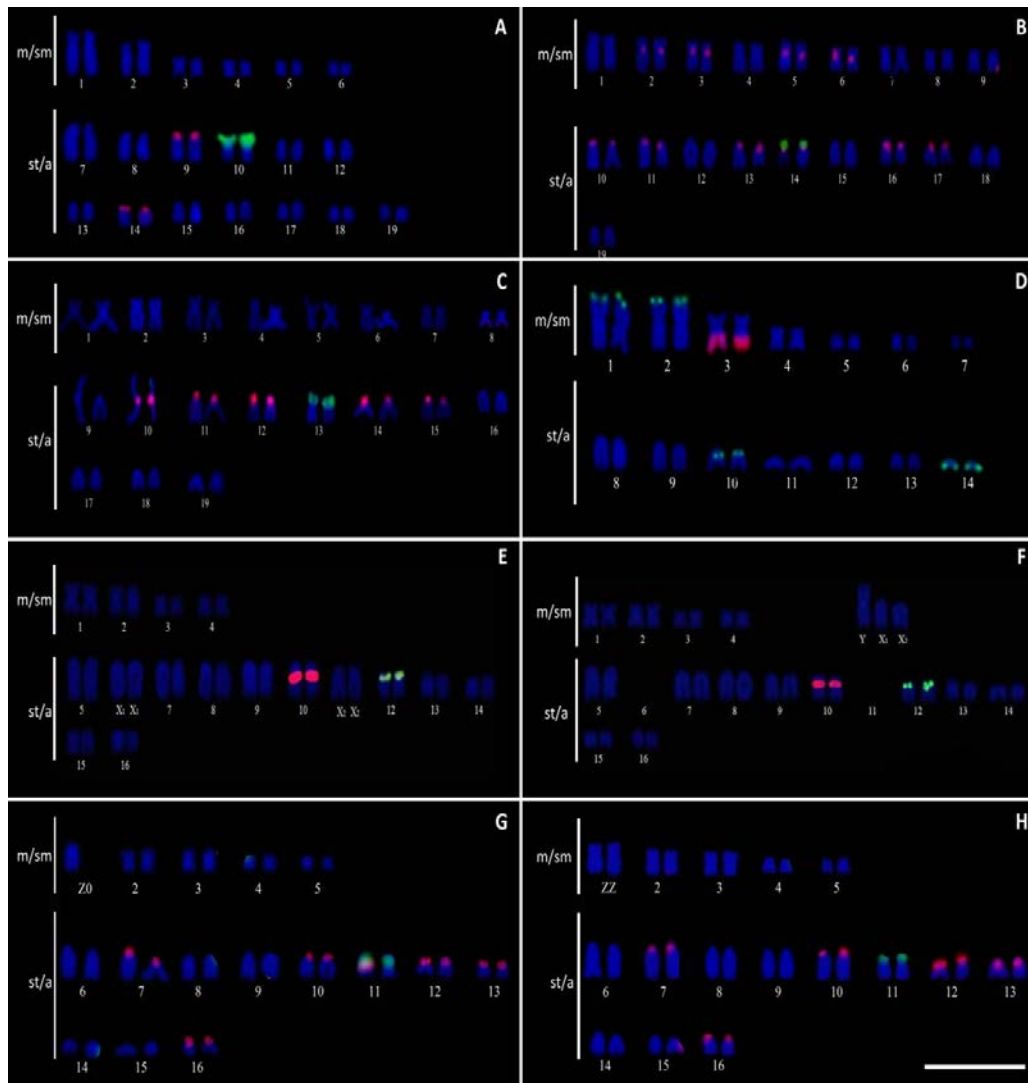


Figura 3: Cariótipos corados com DAPI após aplicação da técnica de FISH utilizando sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (Verde). Em A) *E. limbata*; B) *E. microstoma*; C) *E. virescens*; D) *Eigenmannia* sp1; E-F) exemplares macho e fêmea de *Eigenmannia* sp2 e G-F) exemplares fêmea e macho de *Eigenmannia* aff *trilineata*. A barra representa 10 μ m .

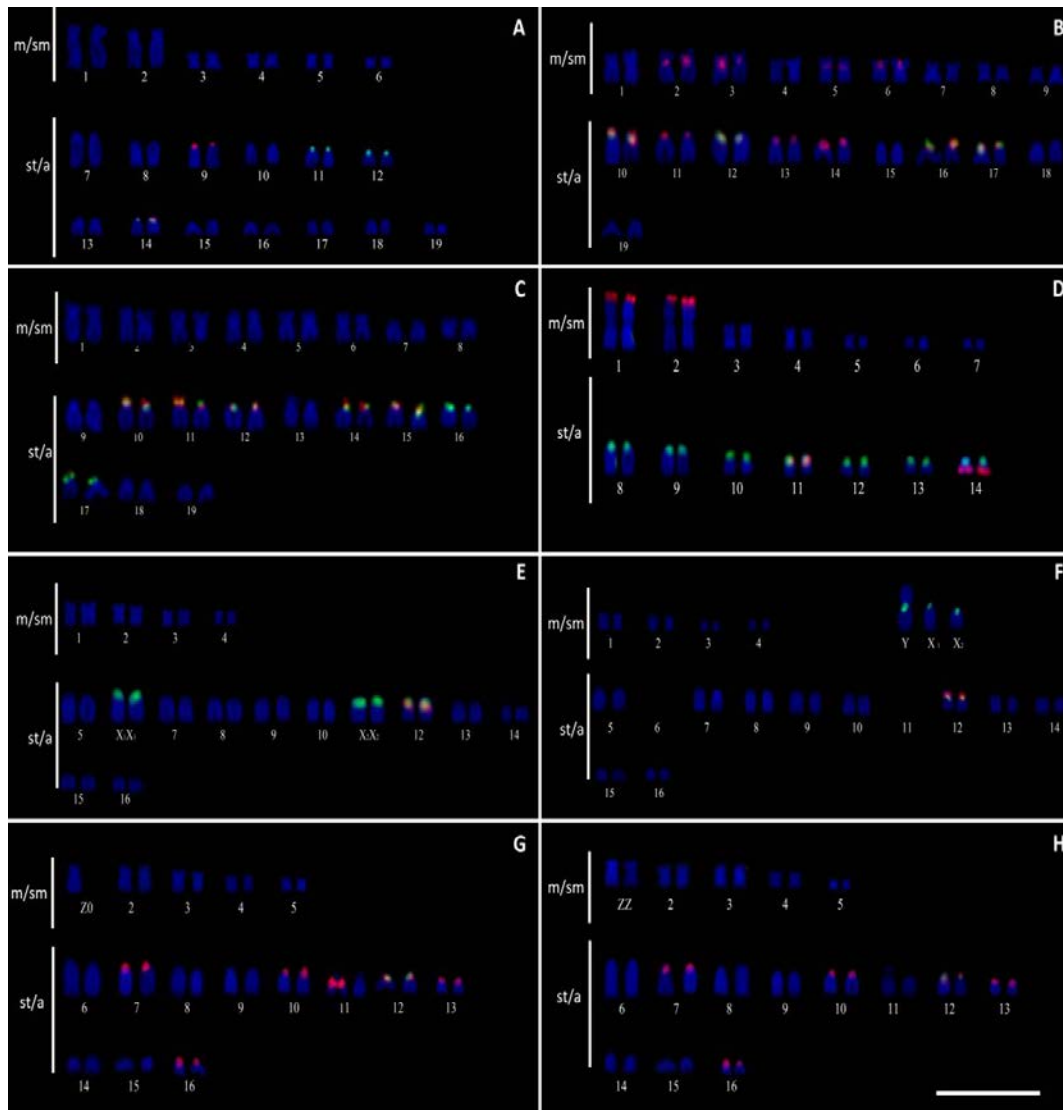


Figura 4: Cariótipos corados com DAPI após aplicação da técnica de FISH utilizando sondas de DNAr 5S (vermelho) e DNAsn U2 (Verde). Em A) *E. limbata*; B) *E. microstoma*; C) *E. virescens*; D) *Eigenmannia* sp1; E-F) exemplares macho e fêmea de *Eigenmannia* sp2 e G-F) exemplares fêmea e macho de *Eigenmannia* aff *trilineata*. A barra representa 10 μ m.

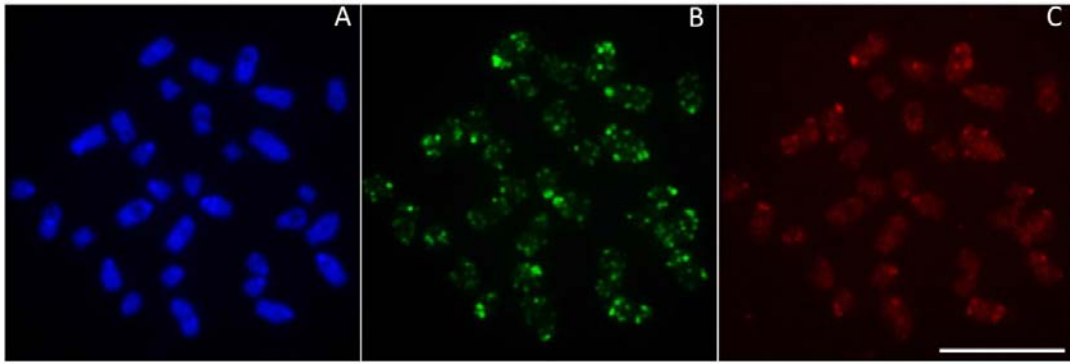


Figura 5: Colocalização dos sítios para histona H3 (verde) (B) e histona H4 (vermelho) (C) nos cromossomos de *Eigenmannia aff trilineata*. Após a aplicação da técnica de FISH, os cromossomos foram corados com DAPI (A). Na figura, metáfase de *Eigenmannia aff trilineata*. A barra representa 10 μ m.

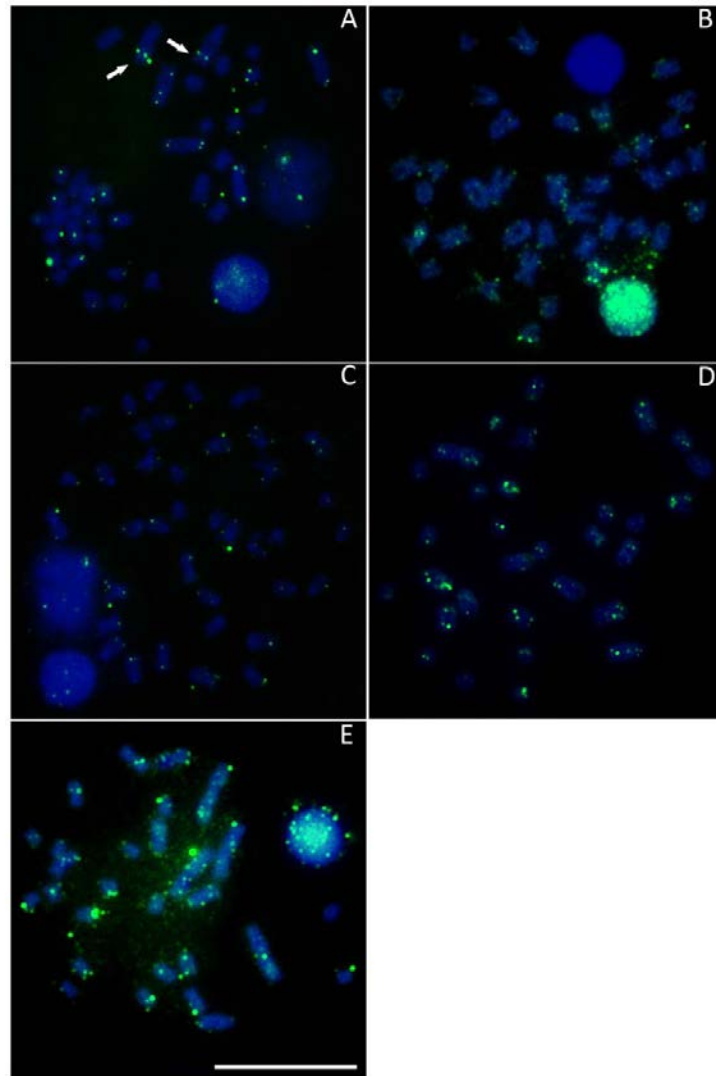


Figura 6: Distribuição dos sítios de histona H3 (verde) nos cromossomos de *Eigmannia*. As setas destacam clusters destas sequências em *E. limbata* (A); em *E. microstoma* (B); em *E. virescens* (C); em *Eigmannia* sp1 (D) e em exemplar macho de *Eigmannia* sp2 (E). Após a aplicação da técnica de FISH os cromossomos foram corados com DAPI. A barra representa 10 μ m.

Referencias

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Capítulo 2

***Eigenmannia* sp2 X_1X_2Y : Sistema múltiplo de cromossomos sexuais ou caráter ligado ao sexo? Novas evidências citogenéticas sobre a formação do cromossomo Y.**

Resumo

Os Gymnotiformes são um grupo de peixes caracterizados por uma grande variabilidade em relação aos números diplóides de cromossomas e aos sistemas de determinação do sexo entre as espécies, destacando os sistemas simples XX / XY , ZZ / ZW , hemigamético $ZZ/Z0$ e múltiplo X_1X_2Y . Isso os torna excelentes modelos para estudar a origem e evolução dos cromossomos sexuais. Neste trabalho, analisamos a distribuição cromossômica de três classes de DNAs repetitivos (5S, 18S rDNA e U2 snDNA) e comportamento cromossomas durante a meiose do sistema múltiplo X_1X_2Y em *Eigenmannia* sp2, a fim de obter novas provas sobre a formação deste sistema de cromossomos sexuais e qual seria seu estado atual de diferenciação.

Os resultados aqui obtidos, permitem estabelecer que a fusão que permitiu a formação do cromossomo Y nesta espécie, seria mediada por sequências de U2 DNAsn presente na região pericentromérica do cromossomo X_1 , X_2 e Y. Além disso o trivalente sexual apresenta um estado completamente sináptico nos espermátócitos de *Eigemannia* sp2, não apresentando setores da cromatina inativos, permitindo inferir que este sistema cromossômico é recente e ainda mantém homologia global entre seus componentes.

Introdução

Os cromossomos sexuais, identificados como elementos genômicos envolvidos na determinação do sexo, são caracterizados por ter a recombinação reduzida, possuir conteúdo genético especializado e sofrer nos mamíferos o fenômeno da compensação de dose (Mank et al. 2014). Têm evoluído numerosas vezes em organismos multicelulares e são a forma mais comum de determinação do sexo em animais (Bachtrog et al. 2014; Ubeda et al. 2014). Uma teoria generalizada sobre a origem e evolução dos sistemas de determinação do sexo (SD) assume um conflito sexual entre alelos antagônicos em loci específico favorável a um sexo e mais prejudicial a outro. Para manter a associação benéfica entre os alelos antagonistas e o locus SD, a recombinação deve ser restringida e favorecer o estado heterozigótico permanente desta porção do par sexual (Bergero and Charlesworth 2009; Martínez et al. 2014). Esta circunstância poderia promover a acumulação de elementos repetitivos e variantes deletérias no cromossomo portador do locus SD, contribuindo para a sua degeneração progressiva e a típica forma heteromórfica do par sexual (Charlesworth et al. 2005).

Em peixes, cromossomos sexuais heteromórficos têm sido descritos em aproximadamente 7% das espécies cariotipadas (Arai 2011). Este grupo, considerado como basal dentro dos vertebrados, apresenta uma ampla variedade de cromossomos sexuais, desde sistemas de determinação do sexo simples e múltiplos, como também sistemas hemizigóticos (Valentim et al. 2013; Da Silva et al. 2014), fazendo com que este grupo de vertebrados seja um modelo interessante para o estudo da origem, manutenção e evolução dos cromossomos sexuais.

Neste contexto, o gênero *Eigenmannia* Jordan & Evermann (1896) se apresenta como um excelente modelo para o estudo da origem, diversificação e evolução dos cromossomos sexuais (Henning et al. 2008b; Da Silva et al. 2011). Este grupo de peixes elétricos, endêmico da região Neotropical (Nelson 2006), se caracteriza por apresentar a maioria dos sistemas de determinação cromossômica descritos para os vertebrados, existindo espécies e citótipos com sistemas simples e múltiplos, com heterogametia masculina XX/XY, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo et al. 2000, 2001b; Moysés et al. 2010) e espécies com cromossomos sexuais heterogaméticos nas fêmeas do tipo ZZ/ZW (Almeida-Toledo et al. 1984, 2002), sistemas hemigaméticos do tipo ZZ/Z0 (Capítulo I), bem como um grande número de espécies e citótipos sem cromossomos sexuais heteromórficos (Almeida-Toledo et al. 2002; Silva et al. 2009a; Arai 2011).

Com a finalidade de estudar a origem e evolução dos cromossomos sexuais no gênero *Eigenmannia*, o presente trabalho oferece novas evidências citogenéticas sobre a formação do neo-cromossomo Y em *Eigenmannia* sp2, espécie/citótipo que se caracteriza por apresentar um sistema múltiplo de cromossomos heteromórficos ligados ao sexo do tipo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo et al. 1984). Utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), foi analisada a distribuição cromossômica de 3 classes de DNA repetitivo, DNAr 5S e 18S e RNAsn U2 e seu possível envolvimento na formação do cromossomo Y nesta espécie. Adicionalmente, foi estudado o comportamento meiótico dos cromossomos heteromórficos desta espécie por imunodeteção das proteínas do elemento lateral do complexo sinaptonêmico em distendidos celulares de células em paquíteno utilizando a proteína SYCP3. Também foi realizada a análise dos níveis de pareamento destes cromossomos utilizando anticorpos para a proteína γ H2AX envolvida no reparo das quebras do DNA ocorridas durante o pareamento dos cromossomos homólogos na prófase I, bem como a localização de

regiões inativas de cromatina por imunodeteção da proteína Histona H3 metilada na lisina 9 (H3K9me), para avaliar o nível de diferenciação apresentado por este sistema de cromossomos sexuais.

Considera-se que as informações obtidas pela aplicação desta metodologia de imunofluorescência possam resultar em novos caminhos e respostas com referência à origem e mecanismos envolvidos no processo de diferenciação deste tipo de cromossomos, bem como sobre a atuação destes elementos genômicos na determinação de sexo desta espécie e, por conseguinte, nos peixes.

Material e Métodos

Material biológico e obtenção de cromossomos mitóticos

Amostras de *Eigenmannia* sp2 foram obtidas no Rio Batalha (22°20'S, 48°53'W), componente da bacia hidrográfica do Rio Tietê, Bauru, no Estado de São Paulo, Brasil. Depois de analisados, os espécimes foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), UNESP, Botucatu, São Paulo Brasil.

Preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de fragmentos de tecido da porção anterior do rim dos exemplares, segundo protocolo proposto por Foresti et al. (1993). Foram analisadas 20 metáfases por indivíduo para confirmar o número diplóide e a macroestrutura cariotípica de *Eigenmannia* sp2. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos segundo (Levan et al. 1964). As imagens foram capturadas com uma câmera digital (Olympus DP70) acoplada a um fotomicroscópio de epifluorescência

(Olympus BX61). Os cariótipos foram editados e montados com ajuda do software Adobe Photoshop CS6.

Sondas de DNA repetitivo e experimentos de FISH

Sondas para RNAsn U2, DNAr 5S e 18S foram obtidas diretamente por PCR (Reação em cadeia da polimerase) a partir do DNA genômico de *Eigenmannia* sp2 utilizando *primers* previamente descritos para cada marcador (Pendas et al. 1994; Bueno et al. 2013; Pansonato-Alves et al. 2013). As sondas para RNAsn U2 e DNAr 18S foram marcadas com biotin-16-dUTP (Roche Applied Science), enquanto a sonda para DNAr 5S foi marcada com digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science). Os experimentos de hibridação *in situ* foram preparados usando condições de alta estringência, de acordo com o método descrito por (Pinkel et al. 1986).

As lâminas foram incubadas em RNase (50µg/ml) por 1h a 37°C. O DNA cromossômico foi desnaturado em solução de formamida 70%/2X SSC durante 5 min a 70°C. Em cada lâmina foram depositados 30µL de solução de hibridação (200ng de cada sonda, 50% de formamida, 2X SSC e 10% de Sulfato Dextran). Este mix foi desnaturado a 95°C por 10 minutos separadamente dos cromossomos, pingado nas lâminas e incubado *overnight* em câmara úmida a 37°C. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas em formamida 15% em 0.2x SSC durante 20 min a 42°C, seguindo-se uma segunda lavagem em 0.1x SSC durante 15 min. a 60°C e uma lavagem final à temperatura ambiente em 4x SSC, com 0.5% de Tween-20 durante 10 min. A detecção das sondas foi realizada com Avidina-FITC(Sigma) ou anti-digoxigenin-rhodamine (Roche), sendo que os cromossomos foram contracorados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories).

Espalhados celulares meióticos

Micro-espalhados nucleares meióticos de células paquitênicas de machos de *Eigenmannia* sp2 foram preparados segundo protocolo utilizado por Araya-Jaime et al. (2014). Resumidamente, uma gota de suspensão de células testiculares foi pingada numa lâmina limpa e seca e misturada com duas gotas de sacarose 0,2 M. e duas gotas de Triton X-100 0,2%. A suspensão celular foi fixada em paraformaldeído 4% e deixadas secar ao ar. As lâminas secas foram lavadas em solução de Photo-flo (Kodak) 0,08%, deixadas para secar no ar e posteriormente reidratadas em PBS 1X.

Immuno-FISH em espalhados celulares meióticos

Lâminas com espalhados celulares meióticos foram incubadas em buffer citrato 0,01M pré-aquecido a 90°C durante 20 min. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida aquecida a 37°C durante 1h, segundo Araya-Jaime et al. (2015). A solução de incubação contém anticorpos contra a proteína do complexo sinaptonêmico 3 de Medaka (SYCP3) (Iwai et al. 2006) diluído a 1:100 em PBS, anticorpo monoclonal de rato contra histona H3 monometilada na lisina 9 (H3K9me Upstate, Cat. No. 05-636) 1:100 em PBS ou anticorpo monoclonal de rato contra Histona H2 AX fosforilada na serina 139 (γ H2AX; Upstate, Cat No. 05-636) diluído a 1:3000 em PBS.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com IgG de burro anti-coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Jackson Immuno Research Laboratories) durante 1h à temperatura ambiente. A solução para a segunda incubação também continha anticorpos de cabra anti-IgG em rato conjugado com Texas Red, (Invitrogen, Cat No. A-31553.), ambos diluídos a 1:100 em PBS. As lâminas foram subsequentemente lavadas em 2XSSC durante 5 minutos, desidratadas numa série ascendente de etanol (70, 80, e 100%) e desnaturadas em formamida 70%

durante 3 min a 65°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 2X SSC e desidratadas numa série de etanol crescente durante 3 min antes da hibridação. Foram utilizadas as mesmas misturas de hibridização e pós-hibridação para realizar immuno-FISH em espalhados celulares meióticos. As imagens foram capturadas e tratadas tal como descrito anteriormente.

Resultados

Macro estrutura cariotípica

Os exemplares de *Eigenmannia* sp2 aqui analisados apresentaram a mesma estrutura cariotípica já descrita para a espécie/citótipo em estudos anteriores (Almeida-Toledo et al. 1984; Almeida-Toledo et al. 2002; Henning et al. 2010; Sene et al. 2014). Enquanto as fêmeas apresentam número diplóide de 32 cromossomos, os machos apresentam 31 cromossomos em seus cariótipos, sendo identificada a existência de um sistema de múltiplos cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$. A redução do número diplóide nos machos desta espécie/citótipo é consequência da fusão cêntrica envolvendo cromossomos dos pares 6 e 11, dando origem a um macro cromossomo único identificado como neo-Y (Sene et al. 2014).

Mapeamento físico de sequências repetitivas

A detecção e localização simultânea das sequências de DNAr 18S e 5S utilizando sondas específicas pela técnica de Dual Color-FISH mostraram que ambos os genes estão localizados em dois pares de cromossomos acrocêntricos distintos, não ocupando uma posição sintênica. Os *clusters* de DNAr 18S foram localizados na região

mediana do braço longo nos cromossomos do par 10, enquanto os sítios para DNAr 5S ocupam a região pericentromérica no par 12 (Figuras 1A e 1C). A aplicação das técnicas de FISH para os genes de RNAr 5S e U2 RNAsn revelaram que estas sequências estão co-localizadas no braço curto do par 12. Além disso, sequências RNAsn U2 foram detectadas na mesma região dos pares 6 (X_1) e 11 (X_2) (Figura 1B). Como consequência da fusão dos cromossomos dos pares 6 e 11 nos machos, os sítios para RNAsn U2 foram localizados na região pericentromérica do cromossomo Y e na mesma região dos cromossomos 6 (X_1) e 11 (X_2) (Figura 1D).

Imunodeteção e immuno-FISH em espalhados celulares meióticos

Catorze bivalentes e um trivalente foram identificados nos espermatócitos de *Eigenmannia* sp2 com a aplicação da técnica de imunodeteção das proteínas SYCP3, sendo que o trivalente corresponde à associação dos cromossomos sexuais X_1X_2Y (Figura 2). O trivalente sexual detectado pelo anticorpo anti-SYCP3 (Figura 2A) foi facilmente identificado pelo grande tamanho, ressaltando seu estado de completa sinápse.

A imunodeteção de regiões cromossômicas inativas utilizando anticorpos anti-histona 3 metilada na lisina 9 (H3K9me) permitiu identificar um sinal positivo para este marcador na porção média de um cromossomo pequeno, presumivelmente localizada no par portador da NOR (Figura 2B). Sinais para o anticorpo anti- γ H2AX foram detectados somente nas células em fase de leptóteno (Figuras 3A,B,C), apresentando um padrão disperso, característico deste marcador nesta fase do ciclo celular meiótico. Não foram observados sinais positivos de imunodeteção para anticorpos anti-Histona (γ H2AX) nos cromossomos paquitênicos nem no trivalente sexual de *Eigenmannia* sp2 (Figuras 3D,E,F).

A aplicação da técnica de immuno-FISH para identificação e localização das proteínas SYCP3 e da sonda para RNAsn U2 em células paquitênicas de *Eigenmannia* sp2 permitiu observar a presença de sequências correspondentes a estes sítios genômicos na região mediana do trivalente, comprometendo os braços curtos dos cromossomos X1 e X2 e a região pericentromérica do cromossomo Y durante o processo de pareamento (Figuras 4A,B,C).

Discussão

A origem, diferenciação e fixação dos cromossomos sexuais é um processo relativamente lento e gradual ao longo da evolução, definindo a fixação de um caráter (mutação, rearranjo, amplificação cromossômica, etc.) num dos sexos, como o primeiro passo deste longo processo (Charlesworth et al. 2005; Ubeda et al. 2014). Todos os sistemas de cromossomos sexuais que já foram descritos podem ser encontrados nos peixes, revelando o alto grau de plasticidade cromossômica presente neste grupo de vertebrados (Cioffi et al. 2010; Kitano and Peichel 2012). Deste modo, os peixes, considerados como os vertebrados mais primitivos (Ohno 1974), surgem como um excelente modelo para esclarecer os mecanismos e processos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais em vertebrados superiores.

Entre os representantes da ordem Gymnotiformes existem vários exemplos de espécies de peixes com sistemas múltiplos de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2$ - X_1X_2Y , incluindo *Eigenmannia* sp2 (Almeida-Toledo et al. 1984), *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Almeida-Toledo et al. 2000) e *Gymnotus pantanal* (Da Silva and Margarido 2005). Além disso, devido às relações filogenéticas entre as espécies, estes

cromossomos sexuais são mais provavelmente cromossomos não homólogos (Henning et al. 2008a, 2010). Com o uso de distintas técnicas de citogenética molecular, Almeida-Toledo et al., (2000) e Da Silva et al. (2011) mostraram que a origem de vários cromossomos sexuais heteromórficos nas espécies de Gymnotiformes já descritas envolveu processos de fusão cêntrica entre os proto cromossomos X_1 e X_2 , dando origem a um novo cromossomo Y nos machos dessas espécies. Estas fusões teriam ocorrido pela perda simultânea da porção telomérica dos elementos envolvidos, permitindo a interação de regiões cromossômicas específicas.

O estado de completa sinápse entre os cromossomos no trivalente sexual observado em espermatócitos paquitênicos de *Eigenmannia* sp2 demonstra o alto grau de homologia entre os elementos que o constituem. Adicionalmente, a total ausência de regiões assinápticas e de porções de cromatina inativas ao longo do trivalente, conforme evidenciado por imunodeteção com a utilização dos anticorpos anti- γ H2AX e H3K9me, reforça a evidência da total homologia entre os componentes do trivalente sexual nesta espécie.

O silenciamento da cromatina via metilação de resíduos de histonas é um dos mecanismos epigenéticos mais frequentemente observados na diferenciação e inativação de cromossomos sexuais heteromórficos, juntamente com a observação de regiões não pareadas entre os cromossomos do par sexual (Peters et al. 2001; Kouzarides 2007; Suárez-Villota et al. 2014). Desta maneira, a ausência destes dois sinais permite sugerir que a fusão que originou o cromossomo Y seria um evento recente, encontrando-se ainda em um estado indiferenciado, de perfeita identidade entre seus componentes. Um caso que exemplifica este modelo é proposto para explicar a formação do cromossomo Y em *Gymnotus pantanal*, em que a presença de sequências repetitivas do tipo COT-DNA1 e a perda de elementos teloméricos estariam envolvidas na fusão dos

cromossomos X_1 e X_2 , gerando um trivalente completamente sináptico encontrado nos espermatócitos de indivíduos machos (Da Silva et al. 2011; Utsunomia et al. 2014; Da Silva et al. 2014).

A ocorrência de um sistema similar de cromossomos sexuais foi descrito em traíra, *Hoplias malabaricus*, por Bertollo e Mestriner (1998). A análise do complexo sinaptonêmico em espermatócitos desta espécie por microscopia eletrônica revelou a existência de uma região não pareada no trivalente sexual, correspondente aos braços curtos dos cromossomos X_1 e X_2 . Considera-se que estes segmentos cromossômicos provavelmente possuem sítios não homólogos, originando um trivalente sexual do tipo X_1X_2Y aberto. Em estudos posteriores, Cioffi et al. (2011) analisaram a distribuição cromossômica de marcadores microssatélites em *H. malabaricus* e identificaram a presença de diferentes classes destes marcadores nos cromossomos envolvidos na formação do cromossomo Y, o que permitiu explicar o estado assináptico dos braços curtos no trivalente sexual de *H. malabaricus* observado por Bertollo e Mestriner (1998). As evidências observadas permitem propor que este sistema de cromossomos sexuais encontrar-se-ia em um estado de diferenciação distinto daquele identificado nas espécies *Gymnotus pantanal* (Da Silva et al. 2011; Utsunomia et al. 2014; Da Silva et al. 2014) e em *Eigenmannia sp2* no presente trabalho. Tal fato parece demonstrar também que a perda de homologia é um processo gradual na diferenciação dos cromossomos sexuais nestes organismos (Bachtrog 2006; Bergero and Charlesworth 2009; Bachtrog et al. 2011).

Sob o ponto de vista da análise dos cromossomos mitóticos, o mapeamento de sequências de DNA repetitivo tem sido uma ferramenta importante para o estudo do processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em vários grupos de peixes (Bertollo & Mestriner 1998; Cioffi et al. 2010; Da Silva et al. 2011; Pazian et al.

2013; Borba et al. 2013; Poltronieri et al. 2014; Pansonato-Alves et al. 2014; Almeida et al. 2015), considerando a invasão e acumulação de elementos repetitivos como o último passo no processo de diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais (Livernois et al. 2011). Neste contexto, a localização de sequências para RNAsn U2 na região pericentromérica dos cromossomos sexuais de *Eigenmannia* sp2 permite supor que a interação destas sequências atuaram no processo de fusão dos cromossomos X_1 e X_2 durante a formação do cromossomo Y. Uma vez ocorrida a fusão Robertsoniana, a manutenção das sequências DNAsn U2 permitem explicar a configuração fechada do trivalente, sugerindo que este poderia ser um polimorfismo cromossômico de ocorrência recente neste grupo de peixes. Não pode ser descartada, contudo, a hipótese de que a presença deste elemento trivalente na meiose seria, possivelmente, apenas um caráter ligado ao sexo, uma vez que machos e fêmeas possuiriam a mesma constituição genética, não existindo assim aparentemente, elementos cromossômicos diferenciais para machos e fêmeas nestes cromossomos.

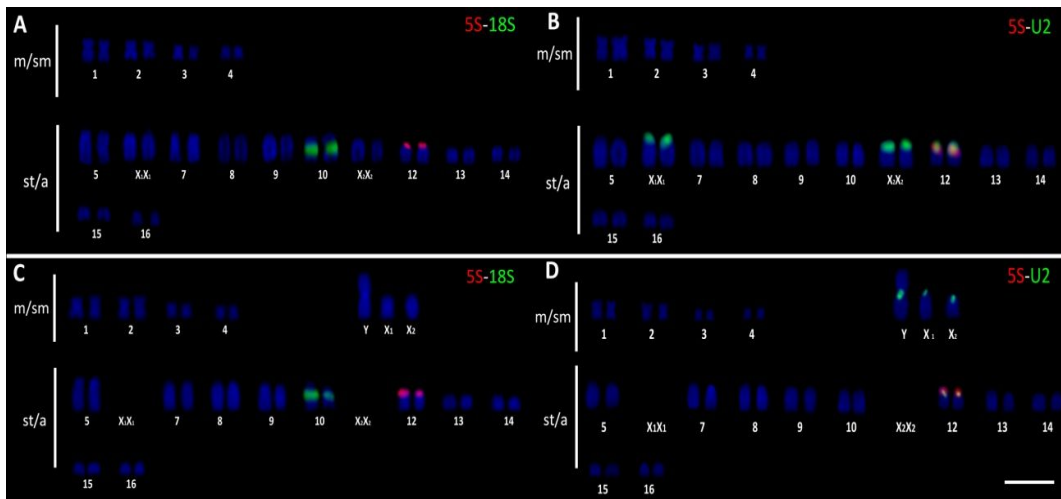


Figura 1: Cariótipos de fêmea (A) e macho (C) de *Eigenmannia sp2* com tratamento de FISH utilizando sondas para DNAr 5S (vermelho), DNAr 18S (verde) em A e C; e para DNAr 5S (vermelho) e U2 DNAsn (verde) em B e D. Os cromossomos foram corados com DAPI. m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; a=acrocêntrico. A barra representa 10μm.

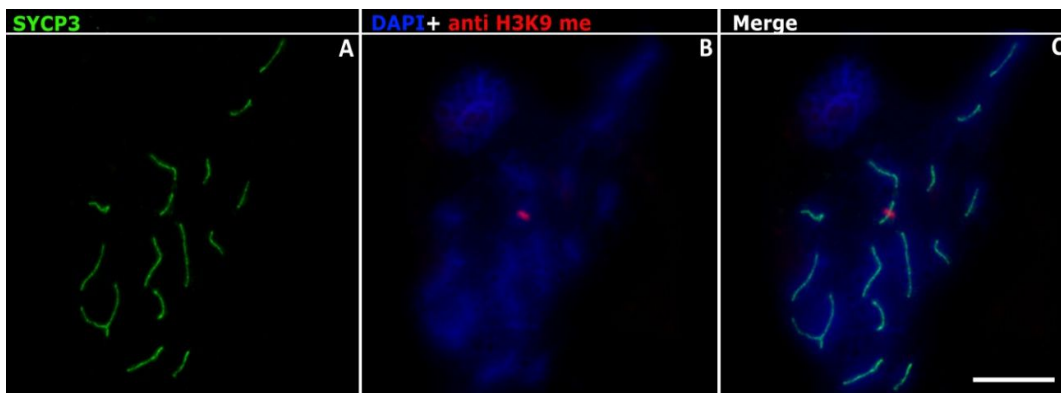


Figura 2: Imunodeteção das proteínas SYCP3 do complexo sinaptonêmico (Verde) e da Histona H3 metilada na lisina 9 H3K9me (vermelho) nas células paquitênicas de *Eigenmannia sp2*. Os cromossomos meióticos foram corados com DAPI. A barra representa 10μm.

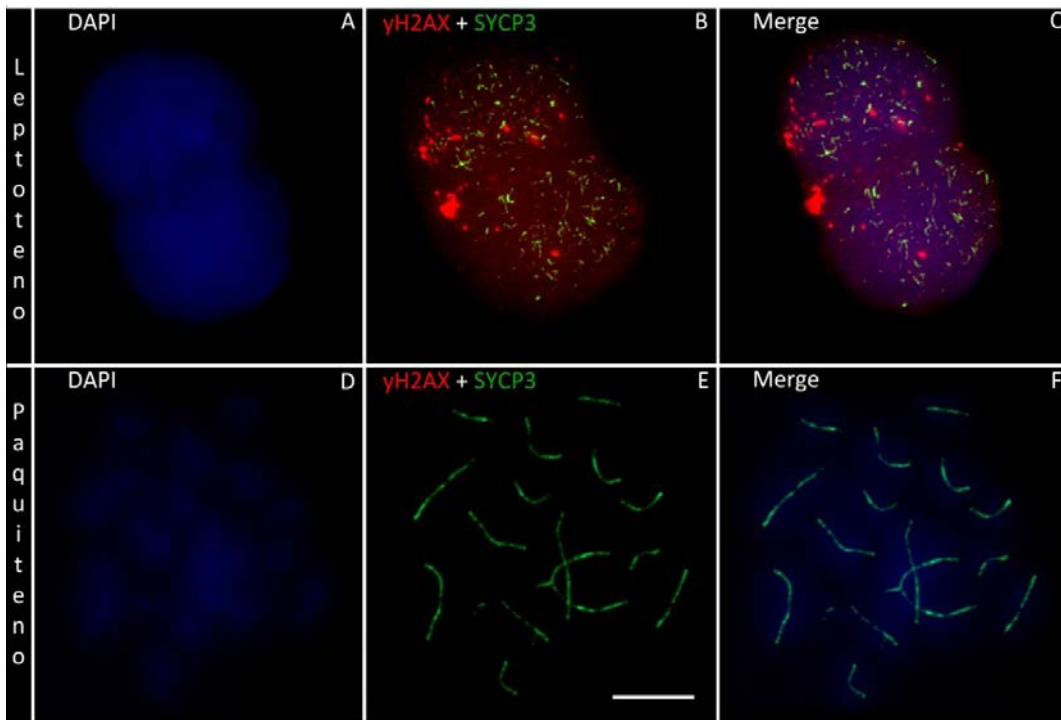


Figura 3: Imunodeteccção das proteínas SYCP3 do complexo sinaptonêmico (Verde) e da proteína de reparo γ H2AX (vermelha) em leptótenos (A-C) e paquítenos (D-F) de *Eigenmannia* sp2. A cromatina e os cromossomos meióticos foram corados com DAPI. A barra representa 10 μ m.

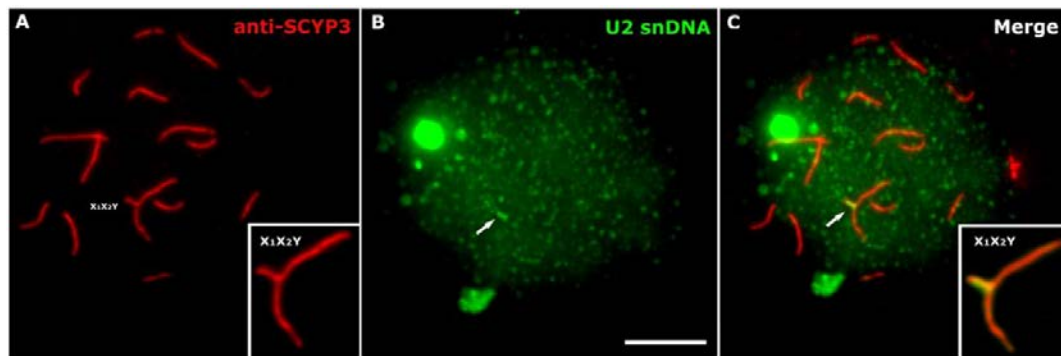


Figura 4: Immuno-FISH utilizando anticorpos anti-SYCP3 (vermelho) e sondas para U2 DNAsn (Verde). Os boxes destacam a constituição sináptica total do trivalente. As setas representam a localização dos sítios para U2 DNAsn sobre a região mediana do trivalente, correspondente à região do braço curto dos cromossomos X1 e X2. A barra representa 10 μ m.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

Capítulo 3

Delimitação de espécies utilizando DNA barcode e análises citogenéticas em representantes de peixes do gênero *Eigenmannia* (Gymnotiformes: Sternopygidae).

Resumo

Eigenmannia é considerado um gênero taxonomicamente confuso devido ao baixo nível de diferenciação morfológica entre suas espécies, o que tem dificultado a descrição formal das mesmas. Assim, atualmente são reconhecidas apenas oito espécies do gênero. Este baixo nível de diferenciação morfológica contrasta fortemente com a variabilidade da macroestrutura cariotípica e dos sistemas cromossômicos de determinação do sexo descritos para o gênero, de forma que se reconhecem vários citótipos dentro de *Eigenmannia*, os quais são facilmente identificáveis pelas suas características citogenéticas. Neste contexto, analisamos 33 sequências do fragmento parcial do gene Citocromo Oxidase I (COI) de seis espécies de *Eigenmannia* — *E. microstoma*, *E. limbata*, *E. virescens*, *E. aff. trilineata*, *Eigenmannia* sp1 e *Eigenmannia* sp2 — a fim de avaliar se os citótipos reconhecidos por análises citogenéticas correspondem às espécies reconhecidas pela abordagem de DNA barcode. Esta análise resultou no reconhecimento de cada agrupamento como uma Unidade Taxonômica Operacional, com valores de divergência genética (K2P) variando entre 2,5 e 17,5% entre as espécies. Assim, concluímos que a utilização conjunta de análises citogenéticas e de DNA barcode pode melhorar a identificação e delimitação das espécies/citótipos em *Eigenmannia*, evidenciando o potencial deste abordagem para estudos taxonômicos e filogenéticos..

Introdução

A ictiofauna Neotropical é uma das mais diversas do mundo, representando mais de 13% de todos os vertebrados existentes (Reis et al. 2003). Desta grande diversidade, aproximadamente 25% das espécies ocorrem nas bacias hidrográficas brasileiras, representando mais de 3000 espécies descritas (Buckup et al. 2007). Embora seja um número relativamente alto, estima-se que mais de 30% das espécies Neotropicais ainda não foram descritas (de Carvalho et al. 2011).

As espécies são a unidade fundamental de comparação em biologia, quer se considere aspectos da anatomia, comportamento, desenvolvimento, ecologia, evolução, genética, biologia molecular, paleontologia, fisiologia ou sistemática (de Queiroz 2007). Para a identificação das espécies são tradicionalmente utilizados caracteres morfológicos. Embora a importância desta abordagem seja indiscutível no reconhecimento das espécies, a taxonomia pode ser pluralista e integrar novas abordagens para solucionar a questão da delimitação de espécies. Isto pode ser utilizado tanto com a finalidade de acelerar a taxa na qual as espécies são descobertas e descritas, quanto no intuito de incorporar a esta delimitação evidências de diferentes naturezas, ou seja, morfológicas, moleculares, ecológicas, evolutivas e comportamentais.

Neste sentido, a biologia molecular tem ajudado no desenvolvimento de um novo conjunto de ferramentas úteis para a identificação de espécies, como alozimas, RFLP, polimorfismos simples de nucleotídeos (SNPs), PCR multiplex e análise de sequências de DNA. (Moyses and de Almeida-Toledo 2002; Lemer et al. 2007; Shaffer and Thomson 2007; Mendonça et al. 2009). O avanço das técnicas moleculares tem se constituído num instrumento de grande utilidade em estudos de biodiversidade, principalmente naqueles em que as ferramentas tradicionais são insuficientes ou incapazes de promover uma identificação perfeita das espécies (Pereira et al. 2011).

Uma ferramenta que tem se mostrado bastante eficiente no processo de delimitação de grupos taxonômicos é o método de DNA barcode, que utiliza o gene Citocromo c oxidase I (COI) na identificação e delimitação de espécies animais (Hebert et al. 2003). Esta ferramenta fornece evidências sobre as Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomy Units - OTU) através do reconhecimento de padrões genéticos dentro dos grupos, dando suporte para os estudos taxonômicos tradicionais (Rodriguez et al. 2008; Pereira et al. 2011). Uma vez que vários fatores podem afetar a taxa de sucessos na aplicação do método do DNA barcode, Barraclough et al. (2009) relata que métodos estatísticos têm sido propostos para analisar os dados de DNA barcode, a fim de identificar os limites entre as espécies e delimitar as OTU. Neste sentido, Ratnasingham & Hebert (2013) indicam o GMYC (General Mixed Yule Coalescent model) como uma abordagem bastante eficiente em identificar as OTU, inclusive em grupos muito diversos de organismos.

Vários grupos de peixes Neotropicais apresentam problemas na identificação das suas espécies devido a descrições originais incompletas, geralmente realizadas com poucos exemplares e/ou em estágio juvenil, além de utilizar material-tipo em mal estado de conservação ou perdido, impossibilitando a realização de comparações. Some-se a isto a ausência de estudos, de diagnose recente e de caracteres morfológicos suficientes para a separação das espécies.

Um exemplo deste problema taxonômico ocorre em *Eigenmannia* Jordan & Evermann (1896), gênero de "peixes elétricos" endêmico da região Neotropical, onde apresenta ampla distribuição geográfica, ocupando componentes das principais bacias hidrográficas desta região (Mago-Leccia 1994; Alberts 2015). Este gênero é atualmente constituído por oito espécies, que podem ser divididas em dois grupos (Mago-Leccia 1994; Albert 2001): o grupo *microstoma*, composto por indivíduos de corpo grande e

escuro na maturidade sexual, que inclui as espécies *E. microstoma*, *E. humboldtii*, *E. limbata* e *E. nigra*; e o grupo *virescens*, cujos membros representantes possuem duas ou três linhas laterais longitudinais em seus corpos na maturidade sexual, sendo representado pelas espécies *E. virescens*, *E. trilineata* e *E. vicentespelaea* (Silva et al. 2009b; Alberts 2015), sendo que a posição de *E. macrops* nestes grupos ainda é indefinido (Bichuette and Trajano 2006). Apesar desta classificação, *Eigenmannia* é considerado um gênero taxonomicamente confuso, principalmente devido à falta relativa de variação morfológica entre as espécies, consequência provável da sua recente diversificação, o que dificulta a definição de caracteres diagnósticos efetivos (Mago-Leccia 1994; Albert 2001).

Análises citogenéticas têm auxiliado a desvendar a variabilidade oculta neste gênero, permitindo reconhecer e individualizar facilmente citótipos por características da sua macroestrutura cariotípica. Nesta categoria pode-se incluir citótipos e espécies como *Eigenmannia* sp1, caracterizada por possuir cariótipo com 28 cromossomos; *Eigenmannia* sp2 caracterizada por possuir um sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2 - X_1X_2Y$ (Almeida-Toledo et al. 1984); e de diferentes populações identificadas como *E. virescens*, que apresentam citótipos com cromossomos sexuais simples dos tipos XX/XY ou ZZ/ZW, além de citótipos homomórficos, sem cromossomos sexuais (Silva et al. 2009b; Moysés et al. 2010).

A grande variabilidade cariotípica encontrada entre as espécies do gênero *Eigenmannia*, principalmente em relação ao número diplóide, estrutura cariotípica e sistemas de heteromorfismos ligados à determinação do sexo, somados à ausência de caracteres diagnósticos para o reconhecimento das espécies, faz deste grupo de peixes um excelente modelo para testar a hipótese de que citótipos com características citogenéticas claramente reconhecíveis possam representar OTU distintas. Neste

contexto, o presente trabalho utilizou a abordagem de caracterização citogenética aliada a análises baseadas na caracterização do gene COI, a fim de auxiliar na identificação das espécies e discutir os limites de definição das unidades biológicas.

Material e Métodos

No presente trabalho foram analisadas 6 espécies/citótipos do gênero *Eigenmannia* de ocorrência em 7 localidades totalizando 33 indivíduos, pertencentes a componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 1).

Análise Molecular

O DNA total foi obtido a partir de fragmentos de tecido de fígado e de músculos, utilizando o sistema de extração Dneasy Blood & Tissue kit (QiagenTM). As amostras foram preservadas em tampão TAE até a execução do processo de amplificação. As sequências correspondentes ao gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram amplificadas com a utilização dos *primers* Fish F1 e Fish R1, descritos por (Ward et al. 2005). A amplificação foi efetuada utilizando 25µl de uma solução contendo 16,1µl de água destilada, 2,5µl de dNTP (8mM), 2,5µl de tampão 10X, 1,2µl de cada *primer* (10µM) e 0,5µl de DNA Polimerase (5u/µl).

Cada ciclo de PCR consistiu da desnaturação do material por 5 minutos a 95°C, hibridação por 45 segundos a 52°C e extensão por 1 minuto a 68°C. Esse ciclo foi repetido 30 vezes e o passo final incluiu uma extensão por 5 minutos a 68°C. Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. O DNA amplificado foi purificado com ExoSap-IT (USB Corporation) e

sequenciado com a utilização do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1*(Applied Biosystems). O DNA foi sequenciado num sequenciador automático de DNA modelo 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems), disponível no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência, UNESP, campus de Botucatu.

Foram obtidas sequências consenso a partir das sequências *forward* e *reverse* de cada amostra utilizando o programa Geneious 4.8 (Kearse et al. 2012). Essas sequências foram alinhadas usando-se o editor MuscleClustalX (Edgar 2004) acoplado ao Geneious 4.8. Para estudo das sequências foram obtidas as distâncias genéticas *pairwise* intragrupos e intergrupos utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA 1980) através do programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013). O nível de confiança da configuração dos ramos obtidos no agrupamento foi avaliado usando o método de *bootstrap* (1000 repetições).

Delimitação identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU)

Para delimitação das espécies e identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomy Unit - OTU) foi utilizado o programa General Mixed Yule Coalescent Model (GMYC), com o modo Birth/Death, que considera tanto a probabilidade de especiação quanto de extinção. O GYMC é um programa que busca determinar o ponto de transição dos processos evolutivos que ocorrem em nível de espécie (especiação e extinção) e aqueles que ocorrem em nível populacional (coalescência), segundo Pons et al. (2006). Uma vez que uma das premissas do GMYC é de que não haja politomias, foi utilizada a ferramenta *online* ElimDupes para a busca e remoção dos haplótipos repetidos. Posteriormente, foi realizada a construção de uma árvore ultramétrica com relógio molecular relaxado utilizando um modelo de

distribuição de tempo log-normal, com a utilização dos programas BEAUTi e BEAST (Drummond et al. 2012).

Para estimar a árvore ultramétrica foi utilizado o modelo evolutivo de nucleotídeos, com a aplicação do modelo HKY com correção Gama. Foram amostradas 30.000.000 de árvores a cada 1.000 gerações. Os dados foram checados através do programa TRACER v.1.6 (Drummond et al. 2012), a fim de avaliar a necessidade de serem utilizadas corridas extras para alcançar a convergência. Todas as topologias amostradas abaixo da assíntota (3.000 gerações) foram descartadas, como parte de um procedimento de *burn-in*. Os dados resultantes foram utilizados para construir uma árvore consenso por maioria com o programa TreeAnnotator. Então, os *clusters* foram identificados com o programa GMYC, utilizando os pacotes APE e SPLITS no programa R-studio (2012), tendo sido como método utilizado o de limiar único com parâmetros padrões.

Deste modo, foram analisadas em conjunto sequências de COI geradas para as espécies/citótípos cariotipadas e sequências de *E. virescens* (bacia do alto rio Paraná), *E. trilineata* (alto Paraná e Paraguai), *G. inaequilabiatus*, *S. macrurus* (alto Paraná e Paraguai) e *B. pinnicaudatus* a partir de amostra disponíveis no Museu de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência, UNESP, campus de Botucatu.

Resultados

Análise da macroestrutura cariotípica

Os resultados da análise cariotípica das espécies de *Eigenmannia* foram apresentados no capítulo I e estão sumarizados na Tabela 2. Todas as espécies/citótipos de *Eigenmannia* aqui estudadas são facilmente distinguíveis pelas características macroestruturais dos seus cariótipos, com relação ao número diplóide e fórmula cariotípica.

Delimitação e Identificação das OTUs.

Foram obtidas sequências *barcode* com mais de 500pb para 33 espécimes de *Eigenmannia*. Alterações sequenciais dos tipos *Stop* códon, deleção e inserções não foram observadas nas sequências obtidas. Após o alinhamento e edição, a matriz final apresentou 652 caracteres, dos quais 496 posições eram conservadas e 156 eram variáveis, com 23,2% de Adenina, 31,6% de Citosina, 27,3% de Timina e 17,9% de Guanina. A análise da distância genética indicou que as espécies/citótipos de *Eigenmannia* diferem entre si por valores que vão de 2,7 e 17,5% de distância K2P e que há baixa variação genética dentro dos grupos (de 0,0 a 0,4%), conforme apresentado na Tabela 1.

A análise GMYC utilizando o modelo Birth/Death indicou o reconhecimento de seis OTUs entre as amostras cariotipadas de *Eigenmannia* (Figura 1), sendo consistente com a separação obtida na análise cariotípica destas amostras. Quando adicionadas sequências de COI para outros representantes de Gymnotiformes, incluindo sequências de representantes de espécies/populações de *Eigenmannia* não cariotipadas, foram novamente recuperadas as seis OTUs derivadas da análise cariotípica (Figura2), com a

incorporação de um representante de *E. virescens* da bacia do alto Rio Paraná no clado de *Eigenmannia* sp2, e de um representante de *E. trilineata* da bacia do Rio Paraguai no clado de *E. aff. trilineata* (ZZ/Z0).

Discussão

A abordagem considerando a utilização da técnica de DNA barcode surgiu de uma crescente necessidade da ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de forma mais acurada e rápida. Com relação aos peixes, a identificação errônea ou imprecisa de espécies tem se apresentado como um problema significativo para muitas áreas, tanto aquelas relacionadas à identificação das espécies quanto outras relativas ao seu manejo e conservação (Leonart et al. 2006), sendo que abordagens exclusivamente morfológicas têm apresentado limitações com relação à identificação de indivíduos jovens, bem como para a identificação de *taxa* crípticos.

Durante o processo de especiação, os caracteres afetados são altamente diversificados, de forma que as alterações não ocorrem ao mesmo tempo ou em uma ordem regular (de Queiroz 1999), sendo que as fronteiras entre as novas espécies tornam-se cada vez mais evidentes à medida que o tempo passa (de Queiroz 2007). No entanto, no início deste processo - conhecido como Zona Cinza - os limites entre as espécies são dificilmente identificados, tornando as fronteiras entre as espécies muito subjetivas e dependentes dos conceitos de espécie que são considerados (de Queiroz 2007).

Considerando as características morfológicas pouco diferenciadas em *Eigenmannia*, os resultados aqui obtidos indicam que o limite genético/cromossômico

pode preceder o limite morfológico, observando-se uma distância genética interespecífica média de 12,1%, com valor de distância mínima de 2,7% entre *Eigenmannia* sp1 (2n=28) e *Eigenmannia* sp2 (2n=31/32 X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y), e máxima de 17,5% entre *E. limbata* (2n=38) e *E. aff. microstoma* (2n=31/32 ZZ/ZO). A distancia genética (K2P) dentro dos grupos cariotipados apresentou valores próximos a 0,4%, sendo consistente com resultados de DNA barcode para um importante número de espécies da região Neotropical (Pereira et al. 2013).

Os processos de diversificação cariotípica evidenciados nas espécies/citótipos de *Eigenmannia* podem ser consequência de processos de micro-isolamento das suas populações, derivados da baixa mobilidade e baixas densidades que estas geralmente apresentam (Bichuette and Trajano 2015), favorecendo a rápida fixação de rearranjos cromossômicos, quer sejam estruturais ou numéricos (Jablonka and Lamb 1991; Ubeda et al. 2014). Modelos teóricos mostram que as taxas de rearranjos cromossômicos são proporcionais à taxa de seleção e inversamente proporcionais ao tamanho efetivo das populações (Lande 1979), como tem sido proposto para explicar a origem e evolução dos cromossomos sexuais neste gênero, cuja principal hipótese estabelece uma origem independente de todos os sistemas de determinação do sexo cromossômico descritos (Almeida-Toledo et al. 1988,2002; Henning et al. 2008a, 2011). Esta hipótese explicaria a grande diversidade de sistemas cromossômicos de determinação do sexo (conforme comentado no Capítulo I) e outros rearranjos cromossômicos em vias de se diferenciarem em cromossomos sexuais, como foi proposto ocorrer em *Eigenmannia* sp2 (Capítulo II).

A recuperação das seis OTU cariotipadas na análise geral de GMYC corrobora a hipótese de que estes citótipos são unidades evolutivas independentes, que podem ser identificadas através da informação cariotípica e de DNA barcode. Além disso, a

inserção de indivíduos identificados como *E. virescens* e *E. trilineata* nos clados de *Eigenmannia* sp2 e *E. aff trilineata* (ZZ/Z0), respectivamente, reforça a colocação de que estas são ferramentas importantes no estudo das relações entre as espécies, que permitem o reconhecimento de problemas na identificação morfológica destas e podem atuar com valiosas colaborações no processo de reconhecimento e delimitação de espécies.

Assim, considera-se que as informações resultantes do presente estudo contribuíram para um melhor conhecimento da diversidade observada das espécies de *Eigenmannia*, fornecendo evidências moleculares para o reconhecimento de novas espécies além de evidenciar a eficácia das metodologias citogenéticas para este reconhecimento. O uso da metodologia de DNA barcode e de análises cromossômicas conjuntas pode colocar um ponto de partida na identificação das OTUs de forma a direcionar futuros esforços para a descrição formal das espécies.

Tabela 1: Espécies/citótipos de *Eigenmannia* aqui analisadas.

Espécie	Localidade	Coordenadas	Bacia hidrográfica
<i>Eigenmannia virescens</i>	Araras-SP	22° 22'S 47° 25'O	alto Paraná
<i>Eigenmannia microstoma</i>	F. Dumont-MG	17°19'S, 44° 17'O	São Francisco
<i>Eigenmannia limbata</i>	Rio Branco- AC	10° 2'S, 67° 51'O	Amazonas
<i>Eigenmannia aff .trilineata</i>	rio Miranda-MS	19°34'S, 57°01'O	Paraguai
<i>Eigenmannia</i> sp1	Araras-SP/ Colômbia-SP	22°22'S,47°25'O 20°09'S,48°37'O	alto Paraná
<i>Eigenmannia</i> sp2	Bauru-SP	22°20'S, 48°53'O	alto Paraná

Tabela 2: Características da macroestrutura cariotípica dos exemplares de *Eigenmannia* analisados.

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	Sistema de cromossomos sexuais	Bacia hidrográfica
<i>E. virescens</i>	38	4m+12sm+2st+20a	--	alto Paraná
<i>E. microstoma</i>	38	8m+10sm+20t	--	Rio São Francisco
<i>E. limbata</i>	38	8m+4sm+26a	--	Amazonas
<i>E. aff. trilineata</i>	31/32	8m+1sm+22a♀ 8m+2sm+22a♂	ZZ/ZO	Rio Paraguai
<i>Eigenmannia sp1</i>	28	14m+14a	--	alto Paraná
<i>Eigenmannia sp2</i>	31/32	6m+2sm+22a♀ 7m+2sm+24a♂	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ Y	alto Paraná

Tabela3 : Distância genética (Kimura-2-parâmetros) entre as seis espécies/citótipos cariotipadas. Os valores intragrupo estão apresentados na diagonal principal (em negrito). Esp2: *Eigenmannia sp2*; Esp1: *Eigenmannia sp1*; Etrili: *E. aff trilineata*; Elim: *E. limbata*; Emicro: *E. microstoma*; Evires: *E. virescens*.

	Esp2	E sp1	Etrili	Elim	Emicro	Evires
Esp2	0,00±0,00					
Esp1	0,027± 0,007	0,004±0,002				
E trili	0,073± 0,013	0,071±0,013	0,003±0,001			
E lim	0,147± 0,020	0,153±0,020	0,175±0,021	0,00±0,00		
E micro	0,139±0,019	0,137±0,018	0,150±0,019	0,142± 0,019	0,002±0,001	
Evires	0,107±0,015	0,115±0,016	0,138±0,017	0,139±0,018	0,107±0,015	0,002±0,001

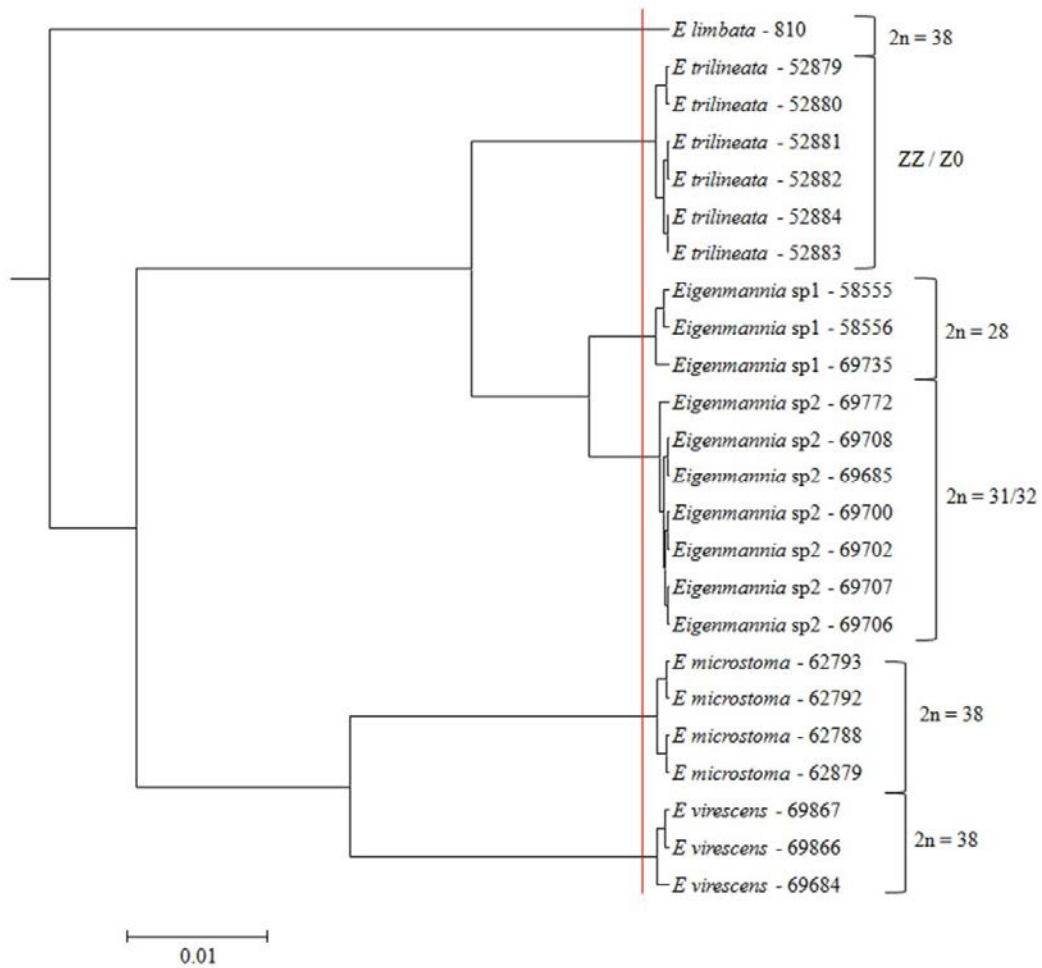


Figura 1: Árvore de inferência Bayesiana de espécies do gênero *Eigenmannia* obtida a partir dos dados de COI das amostras cariotipadas. A linha vermelha vertical na árvore mostra o ponto de transição entre os processos de especiação e coalescência, estimado pelo modelo de limiar único no teste GMYC utilizando o modelo Birth/Death.

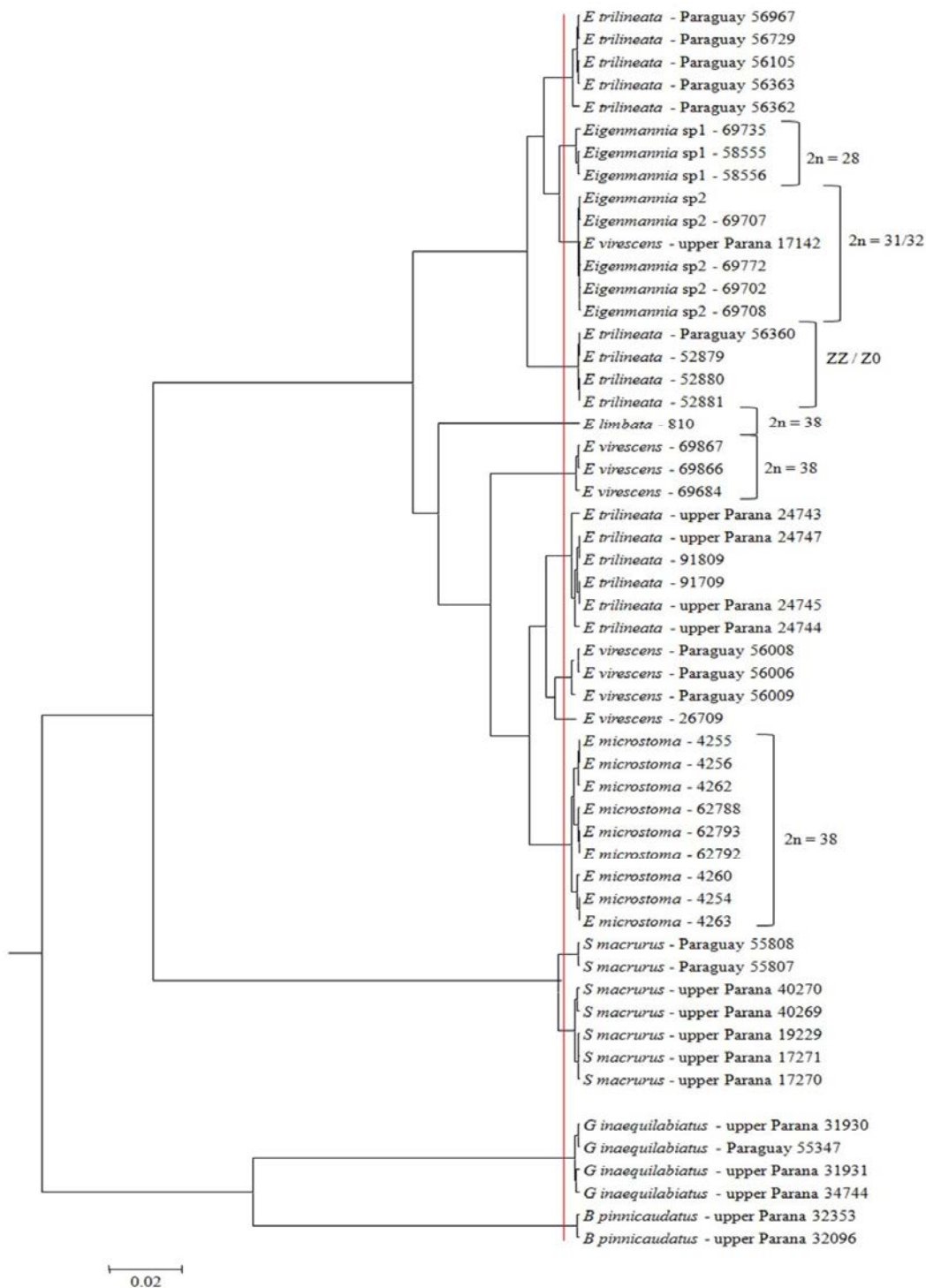


Figura 2: Árvore de inferência Bayesiana obtida a partir dos dados de COI para amostras cariotipadas e outros representantes de Gymnotiformes. A linha vermelha vertical na árvore mostra o ponto de transição entre o processo de especiação e coalescência estimado pelo modelo de limiar único no teste GMYC utilizando o modo de especiação Birth/Death.

Referências

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se relacionadas no final desta tese.

5. Considerações finais

O presente estudo se insere no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu), visando aumentar o conhecimento sobre a composição cariotípica geral e estrutura molecular dos cromossomos nas espécies deste grupo, incluindo espécies que apresentam heteromorfismos cromossômicos ligados ao sexo.

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes representantes do gênero *Eigenmannia* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução deste grupo biológico. Como já constatado anteriormente, estes peixes apresentam uma macroestrutura cariotípica variável, com números diplóides que vão de 28 a 48 cromossomos, sendo os cariótipos com 38 cromossomos os mais frequentes. Além disso, este gênero se caracteriza por apresentar uma grande variedade com relação aos tipos de polimorfismos identificados como cromossomos sexuais, desde o estado de herogametia do tipo simples como XX/XY ligada ao sexo masculino, ou ligada ao sexo feminino ZZ/ZW, como sistemas cromossômicos múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e hemigaméticos ZZ/Z0, sendo este último tipo, que ocorre em *Eigenmannia* aff. *trilineata*, foi descrito pela primeira vez no gênero e para peixes Neotropicais no presente trabalho.

Embora esta variabilidade macroestrutural no cariótipo das espécies tenha sido amplamente relatada por vários autores, características relativas à microestrutura cromossômica foram reveladas mais recentemente com a utilização de mapeamento de marcadores de sequências de DNA repetitivo como DNAr 5S e 18S, bem como para genes específicos como RNAsn U2, que se apresentaram distribuídos diferencialmente nos cromossomos. Isto permitiu individualizar cada cariótipo das espécies analisadas, aumentando o conhecimento da extensa diversificação macro e microcariotípica entre os

representantes deste grupo de peixes, bem como identificar o possível envolvimento de sequências específicas no processo de fusão, determinante para a formação do cromossomo Y nesta espécie.

Diante da extensa variedade de cromossomos sexuais e modos de reprodução dos peixes, o interesse relativo aos processos envolvidos na diferenciação sexual nestes organismos têm sido crescente e cada vez mais inquisidor, sendo os estudos da dinâmica meiótica dos cromossomos sexuais uma ferramenta importante para melhorar o entendimento dos mecanismos de diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos. O uso desta metodologia no estudo do comportamento meiótico dos cromossomos heteromórficos desta espécie por imunodeteção das proteínas do elemento lateral do complexo sinaptonêmico, utilizando como marcador a proteína SYCP3 em distendidos celulares de células meióticas paquitênicas, realizado em paralelo com a análise dos níveis de pareamento destes cromossomos utilizando anticorpos para a proteína γ H2AX envolvida no reparo das quebras do DNA que podem ocorrer durante o pareamento dos cromossomos na prófase I, e a localização de regiões inativas de cromatina por imunodeteção da proteína Histona H3 metilada na lisina 9 (H3K9me), permitiu nova visão do nível de diferenciação apresentado por este sistema de cromossomos sexuais.

Por outro lado, a análise conjunta com dados de mapeamento de sequências de DNA repetitivo permitiu estabelecer que o sistema múltiplo de cromossomos sexuais de *Eigenmannia* sp2 seria um sistema de formação recente, podendo ser identificado simplesmente como um caráter fixado ligado ao sexo nos representantes deste citótipo. Tal hipótese se baseia nas evidências encontradas no processo de pareamento dos cromossomos meióticos. Durante a fase de paquíteno, o trivalente apresenta constituição de emparelhamento completamente fechado, além de não apresentar regiões

assinápticas ou porções de cromatina inativa. Considera-se, pois, que as informações obtidas possam resultar em novos caminhos e respostas sobre a origem destes cromossomos heteromórficos e os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação deste tipo de cromossomos, bem como gerar informações reveladoras sobre a atuação destes elementos genômicos na determinação de sexo desta e de outras espécies de peixes.

Embora a variabilidade cariotípica seja um fato amplamente constatado para este gênero, caracteres morfológicos que permitiriam a identificação das espécies são pouco diferenciados, possivelmente como consequência da ocorrência de um processo recente de diversificação. O uso conjunto de análises cariotípicas com a utilização de técnicas citogenéticas tanto clássicas quanto moleculares, com a aplicação de processos de identificação utilizando a técnica de DNA barcode permitiu melhorar a delimitação das espécies/citótipos de *Eigenmannia*, tendo sido reconhecidas seis Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) com valores de divergência genética (K2P) maiores que 2,5% entre as espécies.

Deve ser destacado que a continuidade dos estudos meióticos em peixes, com a aplicação de técnicas básicas e com o uso de imunofluorescência em distendidos celulares conforme apresentado neste trabalho, será de fundamental importância para aumentar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica, a dinâmica dos processos envolvidos na diferenciação dos cromossomos relacionados ao sexo e, assim, sobre a biologia evolutiva dos peixes Neotropicais.

6. Referências Bibliográficas

- Albert J (2001) Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). 2001 190:1-129.
- Alberts J (2001) Family Sternopygidae. In: Reis R, Kullander S, Carl F (eds.) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 487-491
- Albert J, Crampton W (2005) Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In: Bullock T, Hopkins C, Popper A, Fay R (eds.) Electroreception. Springer Science, pp. 360-409
- Almeida JS, Almeida AS, Miguez VH, et al. (2015) A Unique Sex Chromosome System in the Knifefish *Gymnotus bahianus* with Inferences About Chromosomal Evolution of Gymnotidae. The Journal of heredity 106:177-83. doi: 10.1093/jhered/esu087
- Almeida-Toledo L, Foresti F, Daniel M (2000) Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). Chromosoma 109:197-200.
- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, et al. (2002) Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae). Cytogenetic and Genome Research 99:164-9. doi: 71589
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Péquignot EV, Daniel-Silva MF (2001) XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. Cytogenetics and cell genetics 95:73-8. doi: 57020
- Almeida-Toledo LF, Foresti H, de Filho SAT (1984) Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). Genetica 64:165-169. doi: 10.1007/BF00115340
- Almeida-Toledo LF, Viegas-Péquignot E, Foresti F, et al. (1988) BrdU replication patterns demonstrating chromosome homoeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. Cytogenetic and Genome Research 48:117-120.
- Almeida-Toledo., Foresti F, de Toledo-Filho SA (1998) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In: Olmo E, Redi CA (eds.) Chromosome Today. Birkhauser Basel, pp. 169-182

- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, et al. (2006) Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 128:1-9. doi: 10.1007/s10709-005-0715-1
- Alves-Gomes JA, Ortí G, Haygood M, et al. (1995) Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 12:298-318.
- Alves-Gomes J (2001) The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective. *Journal of Fish Biology* 58:1489-1511.
- Arai, R (2011). *Fish Karyotypes: A Check List* (pp. 1-325). Springer Science & Business Media.
- Araya-Jaime C, Alves-Serrano É, Oliveira C, Foresti F (2014) Meiotic Surface-Spread and Immunodetection for Synaptonemal Complex Proteins in Teleost Fish. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, de Toledo LFA (eds.)CRC PressI Llc, pp. 82-87
- Araya-Jaime C, Serrano ÉA, de Silva DMZA, et al. (2015) Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. *Molecular Cytogenetics*. doi: 10.1186/s13039-015-0108-9
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 16:578-585. doi: 10.1016/j.gde.2006.10.007
- Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank JE, et al. (2011) Are all sex chromosomes created equal? *Trends in Genetics* 27:350-357.
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, et al. (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol* 12:e1001899. doi: 10.1371/journal.pbio.1001899
- Barracough TG, Hughes M, Ashford-Hodges N, Fujisawa T (2009) Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. *Biology letters* 5:425-8. doi: 10.1098/rsbl.2009.0091
- Bergero R, Charlesworth D (2009) The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *TRENDS in Ecology & Evolution* 24:94-102. doi: 10.1016/j.tree.2008.09.010
- Bertollo L, Mestriner C (1998) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome Research* 6:141-147.

- Bichuette M, Trajano E (2006) Morphology and distribution of the cave knifefish *Eigenmannia vicentespelaea* Triques, 1996 (Gymnotiformes: Sternopygidae) from Central Brazil, with an expanded diagnosis and comments on subterranean evolution. *Neotropical Ichthyology* 4:99-105.
- Bichuette ME, Trajano E (2015) Population density and habitat of an endangered cave fish *Eigenmannia vicentespelaea* Triques, 1996 (Ostariophysi: Gymnotiformes) from a karst area in central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 13:113-122. doi: 10.1590/1982-0224-20140095
- Blanco D, Vicari M, Lui R, et al. (2013) The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/X₁Y₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23:127-134.
- Borba R, Silva E, Parise-Maltempo P (2013) Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in *Leporinus Spix, 1829* species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. *Mobile genetic elements* 3:e27460.
- Buckup, P., Menezes, N., & Ghazzi, M (2007). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23* Museu Nacional. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *Plos One* 8:e66532. doi: 10.1371/journal.pone.0066532
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118-28. doi: 10.1038/sj.hdy.6800697
- Cioffi M, Kejnovsky E, Bertollo L (2011) The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 132:289-296.
- Cioffi MB, Bertollo LAC, Bertollo LAC (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105:554-561.

- Colgan D, McLauchlan A, Wilson G (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46:419-430.
- Da Silva EB, Margarido VP (2005) An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73:293-297. doi: 10.1007/s10641-005-2144-5
- Da Silva EL, Busso AF, Parise-Maltempi PP (2013) Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 139:22-8. doi: 10.1159/000342957
- Da Silva M, Matoso DA, Artoni RF, Feldberg E (2014) New Approach Data in Electric Fish (Teleostei: *Gymnotus*): Sex Chromosome Evolution and Repetitive DNA. *ZebraFish* 11:528-535. doi: 10.1089/zeb.2013.0966
- Da Silva M, Matoso DA, Vicari MR, et al. (2011) Repetitive DNA and meiotic behavior of sex chromosomes in *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research* 135:143-9. doi: 10.1159/000330777
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29:1969-73. doi: 10.1093/molbev/mss075
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792-7. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Fagundes V, Christoff AU, Scalzi-Martin J, et al. (2000) X;Y translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenetic and Genome Research* 88:124-129. doi: 10.1159/000015504
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F (2011) Chromosome Mapping of Retrotransposable Elements *Rex1* and *Rex3* in Three Fish Species in the Subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research* 132:64-70. doi: 10.1159/000319620
- Ferreira IA, Poletto AB, Kocher TD, et al. (2010) Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. *Cytogenetic and Genome Research* 129:314-22. doi: 10.1159/000315895
- Foresti, F., Oliveira, C., de Almeida-Toledo, L (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49, 810-813.

- Hashimoto D, Ferguson-Smith M, Rens W, et al. (2013) Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenetic and Genome Research* 139:102-6.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Porto-Foresti F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 134:64-71. doi: 10.1159/000323512
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 270:313-21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, et al. (2011) Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity* 106:391-400. doi: 10.1038/hdy.2010.82
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith M, Almeida-Toledo L (2008a) Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 121:55-58.
- Henning F, Trifonov V, de Almeida-Toledo LF (2008b) Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genetics and Molecular Biology* 31:279-283.
- Howell W, Black D (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Hu L, Sham JST, Tjia WM, et al. (2004) Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. *Genomics* 83:298-302.
- Iwai T, Yoshii A, Yokota T, et al. (2006) Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Experimental Cell Research* 312:2528-2537.
- Jablonka E, Lamb M (1991) Sex chromosomes and speciation. *Proceedings: Biological Sciences* 243:203-208.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, et al. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research* 110:462-7. doi: 10.1159/000084979
- Kimura M (1980) A Simple Method For Estimating Evolutionary Rates Of Base Substitutions Through Comparative Studies Of Nucleotide-Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kitano J, Peichel C (2012) Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental Biology of Fishes* 94:549-558.
- Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128:693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Lande R (1979) Effective Deme Sizes During Long-Term Evolution Estimated From Rates Of Chromosomal Rearrangement. *Evolution* 33:234-251.
- Lemer, S., Aurelle, D., Vigliola, L., Dur, J., Durand, J., & Borsa, P (2007). Cytochrome b barcoding, molecular systematics and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae) *Comptes Rendus Biologies*, 330(1), 86-94. doi:10.1016/j.crvi.2006.09.002
- Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 201-220.
- Li Y-, Cheng Y-, Hsieh L-, et al. (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y-chromosome. *Chromosoma* 114:28-38. doi: 10.1007/s00412-005-0335-7
- Livernois AM, Graves JAM, Waters PD, Graves JAM (2011) The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Heredity* 108:50-58.
- Lleonart J, Taconet M, Lamboeuf M (2006) Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Marine Ecology Progress Series* 316:231-238.
- Mago-Leccia F (1994) Electric fishes of the continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*. 29:1-206.
- Mago-Leccia F (1978) Los peces de la familia Sternopygidae de Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 29:
- Malabarba, L., Reis, R., Vari, R., ZMS, L., & Lucana, C (1998). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. (L. R. Malabarba) (p. 603). EDIPUCRS.
- Manchado M, Rebordinos L, Infante C (2006) U1 and U2 small nuclear RNA genetic linkage: a novel molecular tool for identification of six sole species (Soleidae, Pleuronectiformes). *Journal of agricultural and food chemistry* 54:3765-7.
- Mank JE, Hosken DJ, Wedell N (2014) Conflict on the Sex Chromosomes: Cause, Effect, and Complexity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a017715

- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, et al. (2004) X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* 12:767-776. doi: 10.1007/s10577-005-5077-0
- Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F (eds.) *Fish cytogenetics*. CRC Press, pp. 423-432
- Martínez, P., Viñas, A. M., Sánchez, L., Díaz, N., Ribas, L., & Piferrer, F (2014). Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture *Frontiers In Genetics*, 5, 340. doi:10.3389/fgene.2014.00340
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature genetics* 1:24-8. doi: 10.1038/ng0492-24
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, et al. (2009) Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Molecular Ecology Resources* 9:771-3. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02524.x
- Merlo MA, Merlo R, Cross I, et al. (2010) Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes & genetic systems* 85:341-9.
- Milhomem S, Pieczarka J, Crampton W, et al. (2008) Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics* 9:75.
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, et al. (2013) Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *Plos One* 8:e55608. doi: 10.1371/journal.pone.0055608
- Moyses C, de Almeida-Toledo L (2002) Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 25:401-407.
- Moysés C, Daniel-Silva M, Lopes C, Almeida-Toledo L (2010) Cytotype-specific ISSR profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Genetica* 138:179-189.

- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect molecular biology* 14:713-7. doi: 10.1111/j.1365-2583.2005.00603.x
- Nelson J (2006) *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc.
- Neusser M, Münch M, Anzenberger G, Müller S (2005) Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 108:191-6. doi: 10.1159/000080815
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry M (2005) Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genetics and molecular research : GMR* 4:675-683.
- Ohno S (1974) Chordata 1. Protochordata, Cyclostomata, and Pisces. *Animal Cytogenetics* 4:pp92.
- Oliveira C, Almeida-Toledo L (2007) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor B (eds.) *Fish cytogenetics*. *Fish Cytogenetics*, pp. 111-164
- Oliveira C, Almeida-Toledo L, Foresti F, Britski H (1988) Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev Bras* 11:577-624.
- Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2014) Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual XIX 20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular genetics and genomics : MGG*. doi: 10.1007/s00438-014-0947-9
- Pansonato-Alves J, Hilsdorf A, Utsunomia R, et al. (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research* 141:133-142.
- Pansonato-Alves JC, Serrano ÉA, Utsunomia R, et al. (2014) Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*. *Plos One* 9:e107169. doi: 10.1371/journal.pone.0107169
- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, et al. (2013) Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *Genetica* 141:1-9. doi: 10.1007/s10709-013-9701-1

- Pendas A, Moran P, Freije J, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research* 67:31-36.
- Pereira L, Maia G, Hanner R, Foresti F (2011) DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* s2:1-9.
- Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* 14:20. doi: 10.1186/1471-2156-14-20
- Peters AHFM, Mermoud JE, O'Carroll D, et al. (2001) Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nature genetics* 30:77-80. doi: 10.1038/ng789
- Pineau P, Henry M, Suspène R, et al. (2005) A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Molecular Biology and Evolution* 22:582-8. doi: 10.1093/molbev/msi053
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:2934-2938.
- Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, et al. (2014) Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 142:40-5.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, et al. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55:595-609.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N (2013). A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system *Plos One*, 8(7), e66213. doi:10.1371/journal.pone.0066213
- Reed K, Phillips R (1995) Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma*
- Reis R, Kull S, er, Ferraris C (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. 2003 742. Porto Alegre: Edipucrs.
- Rodriguez MS, Cramer CA, S, et al. (2008) Taxonomy of *Ixinandria* Isbrucker & Nijssen (Loricariidae: Loricariinae) based on morphological and molecular data. *Neotropical Ichthyology* 6:367-378.

- Scacchetti P, Pansonato-Alves J, Utsunomia R, et al. (2011) Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. *Comparative Cytogenetics* 5:223.
- Scacchetti PC, Alves JCP, Utsunomia R, et al. (2012) Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research* 136:131-7. doi: 10.1159/000335658
- Sene VF, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, et al. (2014) Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Comparative Cytogenetics* 8:301-311.
- Shaffer HB, Thomson RC (2007) Delimiting species in recent radiations. *Systematic Biology* 56:896-906. doi: 10.1080/10635150701772563
- Silva DS, Milhomem SS, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2009) Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics* 10:74. doi: 10.1186/1471-2156-10-74
- Singer MF (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International review of cytology* 76:67-112.
- Sumner, A (2003). *Chromosomes: organization and function*. (pp. 1-285). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, et al. (2013) Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular Cytogenetics* 6:51. doi: 10.1186/1755-8166-6-51
- Suárez-Villota EY, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Gallardo MH (2014) Homomorphic sex chromosomes and the intriguing y chromosome of *Ctenomys* rodent species (rodentia, ctenomyidae). *Cytogenetic and Genome Research* 143:232-40. doi: 10.1159/000366173
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Ubeda F, Patten MM, Wild G (2014) On the origin of sex chromosomes from meiotic drive. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. doi: 10.1098/rspb.2014.1932

- Ubeda-Manzanaro M, Merlo M, Palazón J, et al. (2010) Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138:787-94.
- de Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, et al. (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *Plos One* 9:e94896. doi: 10.1371/journal.pone.0094896
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, et al. (2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in G . pantanal. *Cytogenetic and Genome Research* 142:286-92. doi: 10.1159/000362258
- Valadkhan S (2005) snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current opinion in chemical biology* 9:603-8. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.10.008
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, et al. (2011) Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. *Cytogenetic and Genome Research* 133:34-42. doi: 10.1159/000322888
- Valentim F, Porto J, Bertollo L, et al. (2013) XX/XO, a rare sex chromosome system in *Potamotrygon* freshwater stingray from the Amazon Basin, Brazil. *Genetica* 141:381-7.
- Vicari, M., Nogaroto, V., Noletto, R., Cestari, M., Cioffi, M., Almeida, M., et al (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal Of Fish Biology*, 76(5), 1094-1116.
- Volff J (2004) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94:280-294.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, et al. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360:1847-57. doi: 10.1098/rstb.2005.1716
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322
- Wiltshire RN, Dennis TR, Sondak VK, et al. (2001) Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 131:97-103.

- Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 6:205-11.
- de Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu PS, et al. (2011) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22 Suppl 1:80-6. doi: 10.3109/19401736.2011.588214
- de Queiroz K (1999) The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. *Species: new interdisciplinary essays*
- de Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56:879-886. doi: 10.1080/10635150701701083.