

JESICA RUIZ SILVA

**Isolamento e Caracterização de Elementos Transponíveis em  
Espécies do Gênero *Brycon* (Characidae, Bryconinae)**

Botucatu - SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Isolamento e Caracterização de Elementos Transponíveis em  
Espécies do Gênero *Brycon* (Characidae, Bryconinae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas - Genética

**Jesica Ruiz Silva**

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Botucatu - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ruiz-Silva, Jesica.

Isolamento e caracterização de elementos transponíveis em espécies do gênero *Brycon* (Characidae, Bryconinae) / Jesica Ruiz-Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Capes: 20200005

1. Peixe - Genética. 2. Characidae. 3. *Brycon*. 4. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: *Brycon amazonicus*; *Brycon orbignyana*; Família *Rex*; Hibridação *in situ*; PCR; Retrotransposons.

Dedico este trabalho à **minha família** que, do jeitinho deles, sempre me apoiaram, me incentivaram e compartilharam desses momentos tão importantes na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos...

... à **Deus**, pois sem Ele não chegaria até onde cheguei;

... à meus pais **Lázaro e Edna**, meu irmão **Jorge**, minha irmã **Juliane**, meus sobrinhos **Ana Laura, Jorge Lucas, Gabriele, Sofia e Rafael**, pelo apoio, paciência e carinho que sempre me proporcionaram, sem vocês nada disso seria possível;

... à minha orientadora **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriane Pinto Wasko**, pelos conhecimentos transmitidos, sempre com muita dedicação e paciência, para a elaboração deste trabalho;

... ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudos;

... à meu querido amigo **Daniel**, por todos os momentos que passamos juntos desde a graduação, sem os quais não teria força pra chegar até aqui, você estará pra sempre no meu coração;

... aos amigos e colegas de laboratório, principalmente à **Bianca, Éder e Valquíria**, que tive a oportunidade de conhecer e compartilhar muitos momentos felizes, à todos obrigado pelo carinho e amizade;

... à **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lígia** pela amizade;

... ao técnico **Renato**, pela grande ajuda com os peixes;

... à **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarida**, que me proporcionou a oportunidade de estar neste centro de grande conhecimento que é a UNESP;

... ao **Prof. Dr. César Martins, Kbelo, Diogo, Andréia, Irani, Danilo, Bruno e Taka**, pelos conhecimentos a mim transmitido e pela amizade;

... ao **Prof. Dr. Alexandre Borges, Zé Filho, Peres e Paulo**, sempre durões mas, também, transmitindo conhecimentos sempre com muito carinho e atenção;

... aos **funcionários do Departamento de Genética e da Pós Graduação**, que sempre me atenderam com muito carinho e dedicação;

... e por último (mas os últimos sempre são os primeiros), ao **Edval**, essa pessoa incrível que estou tendo a oportunidade de conviver, muito obrigada pela ajuda, incentivo, compreensão e carinho que tem por mim, você deixa a minha vida mais feliz;

Para mim, o que importa não é O QUE eu tenho na vida, mas QUEM eu tenho na vida. Por isso guardo todas as pessoas importantes da minha vida em uma caixinha dentro do meu coração!!!

## RESUMO

Grande parte do genoma dos eucariotos é composta de múltiplas cópias de DNA, conhecidas como DNAs repetitivos, cuja função em relação à manutenção, estrutura e funcionamento do genoma ainda precisa ser melhor investigada. Os DNAs repetitivos classificados como elementos transponíveis vêm sendo considerados como um dos principais representantes do genoma de vertebrados e, de maneira particular, os peixes têm chamado atenção em relação à grande diversidade de classes destes elementos encontradas em seus genomas. Visando ampliar os dados acerca de elementos transponíveis em peixes, o presente trabalho teve como objetivos o isolamento e a caracterização de retrotransposons da família *Rex* em duas espécies de Characidae - *Brycon amazonicus* e *B. orbignyanus* - e realizar inferências acerca de sua organização e dinâmica evolutiva. Desta forma, amostras de DNA foram utilizadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar segmentos dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e os fragmentos obtidos foram clonados e sequenciados. Adicionalmente, estes segmentos de DNA foram utilizados como sondas em experimentos de hibridação *in situ* visando identificar a localização cromossômica destes retrotransposons. A identificação de elementos *Rex* em *B. cephalus* e *B. orbignyanus* demonstrou a presença destes retrotransposons não-LTR (*Long Terminal Repetition*) em um maior número de espécies de Characiformes e, especificamente, no grupo Characidae. Os segmentos analisados de *Rex1* e *Rex3* correspondem aos domínios codificantes 3-7 e 1, 2, 2A, A e B do gene da transcriptase reversa (RT), respectivamente. O fragmento de DNA relativo ao retroelemento *Rex6* isolado codifica a porção C-terminal de uma endonuclease. Comparações entre seqüências nucleotídicas de diferentes espécies de peixes levaram à observação de que tais regiões apresentam um alto grau de conservação entre grupos diversos. Embora os dados obtidos para *B. amazonicus* tenham apontado para uma maior similaridade entre *Rex1* e *Rex3* de Characidae e Loricariidae, o que pode ser reflexo do maior grau de relação entre estas duas famílias, ambas incluídas em Ostariophysi, as demais comparações entre *B. amazonicus*, *B. orbignyanus* e outras espécies de peixes não refletiram correlações filogenéticas. De forma similar ao padrão descrito para outra espécie de Characiformes (*Erythrinus erythrinus*), *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* mostraram repetições *Rex1* e *Rex3* organizadas em diversos *clusters* em diferentes cromossomos, tendo preferencialmente um padrão de distribuição dispersa destes elementos. Comparações entre diferentes peixes indicaram que espécies de um mesmo táxon apresentam padrões similares de distribuição destes elementos repetitivos nos cromossomos. Os dados apontam para a proposição de que a aquisição de elementos repetitivos da família *Rex* em peixes provavelmente está associada à transferência horizontal e sua distribuição nos cromossomos segue um padrão similar entre espécies de grupos mais correlacionados filogeneticamente, o que sugere um mecanismo não aleatório de integração, manutenção e evolução destes elementos no genoma destes vertebrados.

## ABSTRACT

A huge part of the eukaryote genome is constituted by multiple DNA copies, known as repetitive DNAs, which role regarding to the maintenance, structure, and function of the genome needs to be better understandable. The repetitive DNAs that are classified as transposable elements have been considered one of the main parts of the vertebrate genome and, particularly, fishes have gain attention due to the presence of many different classes of these elements in their genomes. In order to improve data on fish transposable elements, the present work intent to isolate and characterize retrotransposons of the *Rex* family in two Characidae species - *Brycon amazonicus* and *B. orbignyanus* - and infer on the organization and evolutionary dynamics of these elements. Therefore, DNA samples were used on PCR (Polymerase Chain Reaction) in order to amplify segments of the *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* elements, and the obtained fragments were cloned and sequenced. Additionally, these DNA segments were used as probes throughout *in situ* hybridization procedures to identify the chromosome localization of these retrotransposons. The identification of *Rex* elements in *B. cephalus* e *B. orbignyanus* evidenced the presence of these non-LTR (*Long Terminal Repetition*) retrotransposons in a large number of Characiformes species and, specifically, in Characidae. The analyzed fragments of *Rex1* and *Rex3* correspond to the coding domains 3-7 and 1, 2, 2A, A and B of the reverse transcriptase (RT) gene, respectively. The DNA segment correlated to the *Rex6* element codifies a C-terminal portion of an endonuclease. Nucleotide sequence comparisons among different fish species showed that these regions are highly conserved in diverse groups. Although the obtained data for *B. amazonicus* seemed to point to a higher similarity between *Rex1* and *Rex3* of Characidae and Loricariidae, a fact that could reflect the higher relationship between these two families, both included in Ostariophysi, the additional comparative data on *B. amazonicus*, *B. orbignyanus* and other fish species did not reflect any phylogeny correlations. Similar to the pattern described for other species of Characiformes (*Erythrinus erythrinus*), *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* presented *Rex1* and *Rex3* repetitions that are organized in several clusters on different chromosomes, with a general disperse distribution pattern of these elements. Comparisons among different fish indicated that species that belong to the same taxon present similar distribution patterns for these repetitive elements in their chromosomes. The present data point to the hypothesis that the insertion of *Rex* elements in fish is probably associated to horizontal transfer and that their chromosome distribution follows a pattern that is similar among phylogenetic related groups, which suggest a non randomly mechanism of incorporation, maintenance, and evolution of these elements in the genome of these vertebrates.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Aspectos gerais do grupo de peixes .....	01
1.2 A subfamília Bryconinae .....	02
1.3 Considerações gerais sobre o gênero <i>Brycon</i> .....	03
1.4 <i>Brycon amazonicus</i> .....	05
1.5 <i>Brycon orbignyana</i> .....	06
1.6 Estudos genéticos no gênero <i>Brycon</i> .....	07
1.7 DNA repetitivo.....	08
1.8 Classificação dos elementos transponíveis .....	09
1.9 Elementos retrotransponíveis da família <i>Rex</i> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
3.1 Materiais.....	15
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Extração e quantificação de DNA .....	16
3.2.2 Isolamento de sequências repetitivas por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )....	17
3.2.3 Clonagem de fragmentos de DNA.....	18
3.2.4 Confirmação da presença de insertos nos clones obtidos.....	19
3.2.5 Mini-preparações para obtenção de plasmídeos recombinantes .....	20
3.2.6 Sequenciamento nucleotídico .....	21
3.2.7 Análise das sequências nucleotídicas .....	22
3.2.8 Obtenção de cromossomos mitóticos .....	22
3.2.9 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	23
<b>4 RESULTADOS</b> .....	25
4.1 Sequências nucleotídicas de retroelementos da família <i>Rex</i> .....	25
4.2 Localização cromossômica de retroelementos da família <i>Rex</i> .....	40
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais do grupo de peixes

Dentre os vertebrados, os peixes correspondem ao grupo mais antigo, numeroso e diverso, possuindo mais de 32.000 espécies válidas (Eschemeyer e Fong, 2010). A subclasse Actinopterygii representa o maior grupo de peixes, caracterizados, principalmente, pela presença do aparelho de Weber, um complexo de ossos articulados e ligamentos que se estendem da bexiga natatória ao ouvido interno (Pough, 2003). Os Actinopterygii incluem as infraclases Chondrostei, geralmente considerados peixes primitivos, e Neopterygii, divididos em Holostei e Teleostei. Compõem 42 ordens, 431 famílias e aproximadamente 30.000 espécies (Nelson, 2009). A predominância dos peixes deste grupo indica que tanto os actinopterígeos fósseis quanto os atualmente existentes podem ter taxas de especiação, principalmente alopátrica, mais altas do que aquelas estimadas para outros vertebrados (Pough, 2003).

Entre os Actinopterygii, os peixes teleósteos compreendem o grupo mais diversificado, com aproximadamente 26.840 espécies reconhecidas - distribuídas nas superordens Acanthopterygii, Clupeomorpha, Cyclosquamata, Elopomorpha, Lampridiomorpha, Ostariophysii, Osteoglossomorpha, Paracanthopterygii, Polymyxiomorpha, Protacanthopterygii, Scopelomorpha e Stenopterygii - e encontradas em rios, lagos e oceanos de todo o mundo (Nelson, 2006).

A superordem Ostariophysii, composta por cinco ordens - Characiformes, Cypriniformes, Gonorhynchiformes, Gymnotiformes e Siluriformes - representa cerca de 28% das espécies de peixes teleósteos e 71% das espécies de peixes de água doce (Briggs, 2005). Sua grande diversidade ecológica e morfológica faz deste grupo foco de diversos estudos anatômicos e evolutivos (Reis et al., 2003).

A ordem Characiformes possui uma história evolutiva que antecede a separação total dos continentes americano e africano, que ocorreu aproximadamente no Cretáceo Médio entre 106 e 84 milhões de anos atrás (Lundberg, 1993), e forma um dos maiores grupos de peixes de água doce da região Neotropical e da África, com cerca de 1.674 espécies válidas, distribuídas em 270 gêneros (Nelson, 2006). Os peixes Characiformes podem ser diferenciados dos demais grupos, externamente, por possuir o corpo totalmente coberto por escamas finas (exceto na cabeça), pela presença de nadadeiras pélvicas ou ventrais geralmente situadas atrás da inserção das nadadeiras peitorais, pela ocorrência de raios das nadadeiras

moles não transformados em espinhos pungentes e, geralmente, pela presença de uma nadadeira adiposa (Britski et al., 1999). Por outro lado, os Characiformes apresentam grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula e anatomia interna (Vari, 1998), possuem dieta diversificada e podem ser encontrados em diferentes ecossistemas (Buckup, 1998).

Diversas espécies de grande importância ecológica e econômica encontram-se dentre os Characiformes. No Brasil, distintas espécies deste grupo são utilizadas na pesca comercial e esportiva e na aquicultura, como os curimatás (*Prochilodontidae*), piaparas e piaus (*Anostomidae*), traíras (*Erythrinidae*), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs (*Characidae*), entre outros. Adicionalmente, um grande número de espécies, principalmente da família *Characidae*, possui valor comercial como peixes ornamentais (Chao et al., 2001).

Apesar do crescente avanço nos estudos acerca da diversidade dos peixes Characiformes, incluindo análises taxonômicas e filogenéticas, o número de estudos é ainda restrito e dados mais abrangentes são necessários para uma melhor compreensão da diferenciação e evolução deste grupo de vertebrados.

## 1.2 A subfamília *Bryconinae*

A família *Characidae* representa a maior e mais complexa das famílias da ordem Characiformes, englobando a maior parte dos peixes de água doce do Brasil (Britski, 1972; Britski et al., 1988; Nelson, 1994; Eschmeyer e Fong, 2010) e compreendendo formas herbívoras, onívoras, iliófagas, carnívoras, algumas das quais extremamente especializadas (Britski, 1999). Embora o número de caracídeos ainda não seja exatamente determinado, pode-se considerar a ocorrência de cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros neste grupo, somente na América do Sul (Mirande, 2010).

Dentre as subfamílias de *Characidae*, *Bryconinae* destaca-se como um grupo de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na América do Sul e América Central (Géry e Mahnert, 1992). Britski et al. (1988), do ponto de vista taxonômico, consideram que a subfamília seja constituída por um único gênero - *Brycon* Müller & Troschel 1844. Entretanto, esta disposição não é unânime, já que o próprio gênero é mal definido e reconhecido por uma combinação de caracteres pouco consistentes, alguns destes também compartilhados por outros *Characidae* neotropicais, como *Triportheus*, *Chalceus* e *Salminus* (Weitzman, 1960).

O gênero *Brycon* é usualmente caracterizado por uma combinação de caracteres morfológicos - principalmente pela presença de dois dentes na sínfise do dentário, três ou

quatro fileiras de dentes no pré-maxilar, coracóide não alargado e pela ausência de supramaxilar (Zanata, 2000). Tais caracteres, entretanto, não são restritos a *Brycon* e são considerados plesiomórficos por alguns autores que têm questionado o monofiletismo do gênero. Considerando a proposição de que a subfamília Bryconinae seja composta não somente pelo gênero *Brycon*, Weitzman (1960) agrupa *Brycon*, *Triporthesus* e *Chalceus* em uma única tribo, Bryconini, devido a algumas similaridades que apresentam em relação à forma e à distribuição dos dentes. Géry (1977), apesar de concordar com Weitzman (1960), subdivide a subfamília Bryconinae em três tribos: Bryconini, Salminini e Triporthesini. Por outro lado, Uj (1990) eleva a subfamília Bryconinae ao nível de família, ou seja, Bryconidae, e mantém incluída nesta o gênero *Triporthesus*. Portugal (1990), último revisor de *Triporthesus*, relaciona este gênero a um grande grupo de caracídeos sul-americanos no qual estariam incluídos também *Brycon* e *Salminus*.

Por outro lado, estudos mais recentes, baseados tanto em dados morfológicos como em moleculares, levam à proposição de que o gênero *Brycon* seja monofilético. Dados baseados em 144 caracteres morfológicos de 28 espécies de *Brycon* e 30 espécies de outros Characiformes incluíram no gênero *Brycon* o atual gênero *Chilobrycon* e apontaram para um monofiletismo do grupo, sendo *B. pesu* considerada a espécie mais primitiva (Zanata, 2000). Neste mesmo trabalho, foi refutada a hipótese de relacionamento entre *Salminus* e *Brycon*, sendo este último mais próximo de *Triporthesus*. Castro et al. (2004) também demonstraram, por meio de comparações morfológicas entre *Hemichilus* e os demais componentes da ordem Characiformes, que este gênero forma uma unidade monofilética com o gênero *Brycon*. Entretanto, este estudo propõe que *Hemichilus* e *Brycon* sejam grupos irmãos de *Salminus*. Da mesma forma, a análise de sequências parciais do gene mitocondrial 16S, realizada em 13 espécies de *Brycon* e em *Hemichilus wheatlandii*, também apontou para o monofiletismo do grupo (Hilsdorf et al., 2008).

Apesar das divergências pertinentes ao monofiletismo de *Brycon* e às relações entre espécies deste gênero com outras espécies de Characiformes, atualmente considera-se que a subfamília Bryconinae inclui 42 espécies válidas sendo 40 pertencentes ao gênero *Brycon*, uma ao gênero *Hemichilus* e uma ao gênero *Chilobrycon* (Lima, 2003).

### **1.3 Considerações gerais sobre o gênero *Brycon***

As espécies do gênero *Brycon* compreendem um grupo de peixes neotropicais de água doce, amplamente distribuídas na América Central e Sul (Lima, 2003) e popularmente

conhecidas como matrinhãs, piracanjubas, pirapitingas e piabanhas. No Brasil, espécies de *Brycon* são encontradas na maioria das bacias hidrográficas, tais como bacias Amazônica, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (Lima, 2001). Apresentam médio a grande porte, com exemplares adultos variando entre 15 a 100 cm de comprimento padrão, podendo atingir até 8 Kg (Goulding 1980; Britski et al., 1988). Habitam rios e ambientes aquáticos associados, como lagos marginais e planícies de inundação, principalmente em regiões florestadas (Lima, 2001). São espécies reofílicas e alimentam-se preferencialmente de insetos e vegetais, sobretudo frutos e sementes (Britski et al, 1988), além de larvas de outros peixes e pequenos vertebrados (Faria, 1994; Belmont, 1994; Lima e Castro, 2000).

*Brycon* constitui um grupo de peixes migradores (Howes, 1982) de grande importância econômica para a pesca e para a piscicultura no Brasil (Mendonça e Melo, 1994), devido às suas qualidades quanto ao rápido crescimento e ganho de peso, fácil aceitação de ração artificial, excelente qualidade de carne e boa aceitação entre os consumidores (Saint-Paul e Werder, 1977; Graef et al., 1986). Estes animais também possuem importância como biocontroladores e como biodispersores. A espécie *B. guatemalensis* foi identificada como um agente biológico no controle de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue (Martinez-Ibarra et al., 2002), e também considerada como um dispersor de sementes de *Ficus insipida* (Horn 1997; Banack et al., 2002). Material vegetal é uma parte importante da dieta de espécies adultas do gênero *Brycon* e, assim, estes peixes desempenham um papel na dispersão de plantas de cujos frutos tenham se alimentado (Berra, 2001).

Apesar da importância comercial e ecológica, atividades humanas têm ameaçado algumas destas espécies ou mesmo levado algumas populações à extinção (Braga, 1982; Mendonça e Melo, 1994; Ceccarelli e Senhorini, 1996), devido ao assoreamento de rios, à crescente poluição e à implantação de usinas hidrelétricas (Faria, 1994). A construção de barragens, entre outras alterações, torna o ambiente mais lântico, sem corredeiras, além de alagar as matas ciliares pré-existente, uma das principais fontes de alimento destes animais (Faria, 1994; Tundisi 2003). Devido ao fato das espécies do gênero *Brycon* serem muito apreciadas na pesca esportiva, a captura intensiva também é uma causa importante de seu declínio (Lopera-Barrero, 2007).

A grande preocupação com relação ao desaparecimento das espécies do gênero *Brycon* na natureza pode ser comprovada pela inclusão de *B. devillei*, *B. insignis*, *B. nattereri*, *B. opalinus*, *B. orbignyanus* e *B. vermelha* na Lista Oficial de Fauna Ameaçada de Extinção publicada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Outras espécies do gênero, como *B. lundii*, *B. bahiensis* e *B. erythrura*

encontram-se em listas regionais/estaduais de espécies de peixes ameaçadas no Brasil (Rosa e Menezes, 1996; Lins et al., 1997, Fontana et al., 2002; Machado et al., 2008). Além disso, a espécie *B. orthotaenia* encontra-se classificada como “vulnerável” e outras duas espécies do gênero - *B. amazonicus* e *B. polylepis* - foram designadas como “least concern” junto ao IUCN (International Union for Conservation of Nature) (levantamento realizado em fevereiro de 2012).

Dentre os peixes do gênero *Brycon*, a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o matrinhã (*Brycon amazonicus*) representam as espécies mais estudadas, especialmente devido a seu alto valor comercial (Tortolero et al., 2010). Entretanto, grande parte dos dados acerca destas duas espécies refere-se a estudos de estocagem (Sallum, 1988; Gomes et al., 2000), reprodução induzida (Eckmann, 1984; Romagosa et al., 1994; Narahara et al., 2002), alimentação e nutrição (Borghetti et al., 1991; Pezzato et al., 1994; Moreira et al., 2001; Borba et al., 2003). O aumento dos estudos acerca destas espécies, incluindo dados genéticos, poderá melhor subsidiar programas de conservação, criação e reprodução em cativeiro e também contribuir a análises evolutivas.

#### **1.4 *Brycon amazonicus***

Em recente revisão, Lima (2003) verificou que a espécie *B. cephalus* encontrada na Amazônia brasileira e criada em várias regiões do Brasil é, na verdade, a espécie *B. amazonicus* Spix & Agassiz 1829, comumente conhecida como matrinhã. Desta forma, a distribuição de *B. cephalus* seria restrita ao alto rio Amazonas no Peru e na Bolívia (Lima, 2003). Segundo Borges (1986) e Zaniboni et al. (1988), *B. amazonicus* se caracteriza por ter corpo alongado, comprimento do corpo variável de 2,8 a 3,1 vezes o comprimento padrão e tamanho da cabeça variável de 3,5 a 4,1 vezes o comprimento padrão desta região. Atinge cerca de 50 cm de comprimento e aproximadamente 4 a 5 kg na fase adulta (Melo, 2007).

O matrinhã é uma espécie de grande importância econômica em várias regiões do país, sendo muito apreciada como alimento e peixe esportivo (Wender e Saint Paul, 1978; Graef et al., 1987; Scorvo-Filho et al., 1998; Batista e Petrere, 2003; Batista et al., 2007). Dado seu hábito alimentar onívoro, alimentando-se na natureza de frutos, sementes, flores, restos vegetais, plantas herbáceas, insetos e restos de peixes (Izel et al., 2004; Zaniboni-Filho et al., 2006) e boa aceitabilidade a rações extrusadas e peletizadas, bem como subprodutos agroindustriais (Pizango-Paima, 1997), *B. amazonicus* apresenta facilidade de cultivo em ambientes artificiais (Ferreira et al., 1998; Santos et al., 2006).

O excelente desempenho de *B. amazonicus* em cativeiro e seu alto valor comercial têm despertado grande interesse a estudos voltados ao desenvolvimento e aprimoramento de tecnologia para seu cultivo. De acordo com Brandão et al. (2007), o matrinhã é a segunda espécie de peixe mais cultivada na região Amazônica. Nos últimos anos, diversos estudos em *B. amazonicus* têm sido realizados, como por exemplo, análise de densidade de estocagem (Brandão et al., 2005; Tortolero et al., 2010), alimentação (Frasca-Scorvo et al., 2007), fisiologia (Tavares-Dias et al., 2008; Arbeláez-Rojas e Moraes, 2010; Oliveira et al., 2011), reprodução induzida (Soares et al., 2003), análises estruturais de células germinativas (Ganeco et al., 2001; Romagosa et al., 2001; Camargo et al., 2008), técnicas de criopreservação de espermatozoides (Silveira, 2000; Cruz et al., 2004) e dinâmica populacional (Santos-Filho e Batista, 2009), com o propósito de fornecer maiores subsídios à sua criação e reprodução em cativeiro.

### **1.5 *Brycon orbignyanus***

A piracanjuba, *B. orbignyanus* Valenciennes 1849, é uma espécie de peixe de piracema, originária da Bacia do Prata (Godoy, 1975). De hábito alimentar onívoro, aceita bem dietas artificiais e apresenta rápido crescimento e facilidade de cultivo (Vaz et al., 2000). Na idade adulta, pode atingir cerca de 80-100 cm de comprimento e aproximadamente 5 Kg (Godoy, 1975). Nos últimos anos, *B. orbignyanus* tem despertado grande interesse devido às suas características zootécnicas, associadas à excelente qualidade da carne, rápido crescimento, boa conversão alimentar e facilidade de cultivo, como também por apresentar características desejáveis para pesca esportiva, especialmente seu comportamento agressivo quando fisgada (Mendonça, 1994; Melo, 1994; Feiden e Hayashi, 1999; Vaz et al., 2000; Murgas et al., 2003).

Devido especialmente à construção de barragens hidrelétricas que impedem sua migração no período reprodutivo, desmatamento ciliar, deterioração da qualidade da água provocada pela poluição industrial e urbana, e pesca predatória, *B. orbignyanus* representa uma das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção (COPAM, 1996; IBAMA, 2004; IUCN, 2012). Comumente encontrada na bacia do Paraná, atualmente exemplares da espécie são raros e não têm sido mais encontrados nos rios Tietê, Grande e Paranapanema (Machado et al., 2008).

Nos últimos anos, além de análises direcionadas à alimentação e nutrição (Borba et al., 2006; Zaniboni-Filho et al., 2006), fisiologia e comportamento (Reynalte-Tataje et al., 2002;

Gomiero et al., 2009), têm sido também desenvolvidas análises de células germinativas e técnicas de criopreservação de espermatozoides de *B. orbignyianus*, especialmente com fins conservacionistas e para produção de pescado cultivado (Ganeco et al., 2001; Murgas et al., 2004).

## 1.6 Estudos genéticos no gênero *Brycon*

A maioria dos dados acerca do gênero *Brycon* restringe-se a estudos citogenéticos. São conhecidos os complementos cariotípicos de *B. lundii*, *B. brevicauda*, *B. microlepis*, *B. cephalus*, *Brycon* sp. do Rio Araguaia-MT, *B. orbignyianus* (Margarido e Galetti, 1996), *B. insignis* (Margarido e Galetti, 1996; Almeida-Toledo et al., 1996), *B. reinhardti*, *B. cf. cephalus* (Almeida-Toledo et al., 1996), *B. cf. erythropterum* (Santos et al., 1985), *B. cf. pesu* (Porto et al., 1992), *B. henni* (Lopez et al., 2008) e *B. amazonicus* (Mariguela et al., 2010).

As espécies analisadas até o momento apresentam um complemento cariotípico formado por 50 cromossomos e regiões organizadoras de nucléolos localizadas terminalmente no braço longo do segundo par de cromossomos submetacêntricos, indicando que a família é caracterizada por uma grande estabilidade cariotípica em nível numérico. Estudos de bandeamento C são ainda restritos, tendo sido realizados em poucas espécies (Margarido e Galetti, 1996, 1999; Almeida-Toledo et al., 1996; Mariguela et al., 2010). Da mesma forma, informações sobre a localização cromossômica das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), identificadas por coloração por nitrato de Prata, fluorocromos GC-específicos e hibridação *in situ* fluorescente utilizando sondas de DNAr 18S, foram somente obtidas para um reduzido número de espécies do grupo (Margarido e Galetti, 1996; Almeida-Toledo et al., 1996; Wasko e Galetti, 2000; Mariguela et al., 2010). Dados citogenético-moleculares adicionais para espécies do gênero *Brycon* referem-se somente à localização cromossômica e caracterização da sequência nucleotídica de genes de DNAr 5S (Wasko e Galetti, 2001).

Estudos genético-bioquímicos foram realizados em *B. cephalus* (*B. amazonicus*), *B. erythropterum* (Val e Almeida-Val, 1988), *Brycon* sp. (Galhardo e Toledo Filho, 1987) e *B. reinhardti* (Galhardo e Toledo Filho, 1987; Toledo Filho et al., 1992 a, b). Análises genéticas envolvendo a utilização de marcadores moleculares, tanto de DNA nuclear como de DNA mitocondrial, embora ainda reduzidas, incluem dados direcionados à avaliação de diversidade genética de estoques naturais e/ou cultivados (Wasko e Galetti, 2002; Hilsdorf et al., 2002; Wasko e Galetti, 2003; Wasko et al., 2004; Barroso et al., 2005; Barrero et al., 2006; Santis et al., 2007; Lopera-Barrero et al., 2008; Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Lopera-Barrero et al.,

2010; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Panararis-Antunes et al., 2011; Hurtado-Alarcon et al., 2011) e a inferências filogenéticas (Calcagnotto et al., 2005; Hilsdorf et al., 2008; Antunes et al., 2010; Prioli et al., 2010; Abe, 2011). Apesar destes estudos em *Brycon*, dados associados à caracterização de segmentos de DNA repetitivo são ainda extremamente escassos em espécies deste grupo, restringindo-se a genes de DNAs ribossomais (Wasko e Galetti, 2000; Wasko et al., 2001; Mariguela et al., 2010) e a locos microssatélites (Barroso et al., 2003; Sanches e Galetti, 2006).

### **1.7 DNA repetitivo**

Na maioria dos organismos, uma grande porção do genoma é composta de múltiplas cópias de DNA, conhecidas como DNA repetitivo. Em humanos, apenas 3% do material genético é composto por sequências que codificam cadeias polipeptídicas; o restante compreende as denominadas regiões não-codificadoras. Dentre estas, cerca de 50% corresponde a segmentos de DNA repetido (The Genome International Sequencing Consortium, 2001; Kim et al., 2004; Han et al., 2007).

Enquanto algumas sequências repetidas possuem uma função clara, tais como os DNAs ribossomais, centroméricos e teloméricos, ainda não se sabe ao certo qual o papel de grande parte do DNA repetitivo, até pouco tempo considerado como “DNA lixo” (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). Entretanto, dados mais recentes têm evidenciado que estas sequências são de suma importância para a manutenção e estrutura do genoma e que sua formação deve-se a um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka et al., 2005). Diferentes estudos têm sugerido o envolvimento de sequências repetitivas no processo de replicação do DNA (Li et al., 2002), recombinação (Biet et al., 1999), expressão gênica (Liu et al., 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (Parise-Maltempo et al., 2007; Pokorna et al., 2011), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral (Kazazian, 2004; Biémont e Vieira, 2006). Essas sequências repetidas podem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002). Com o advento do sequenciamento em larga escala de genomas, informações sem precedentes sobre a origem, diversidade e impacto genômico das sequências repetidas vêm sendo geradas para diversos grupos.

No genoma de eucariotos existem, de modo geral, dois diferentes tipos de segmentos de DNA repetitivo: sequências altamente repetitivas (fração do DNA constituída por sequências que se renaturam rapidamente; compreendem até  $10^5$  cópias/genoma) e sequências moderadamente repetitivas (compreendem 10 a 100 cópias/genoma) (Britten et al., 1968). Estes segmentos de DNA repetitivo são também frequentemente classificados em duas principais classes: (1) repetições *em tandem*, como os satélites, minissatélites, microsatélites e os genes de histonas que se agrupam em famílias multigênicas e (2) elementos dispersos, como SINES (*Short Interspersed Elements*) e LINES (*Long Interspersed Elements*) (Jurka et al., 2005).

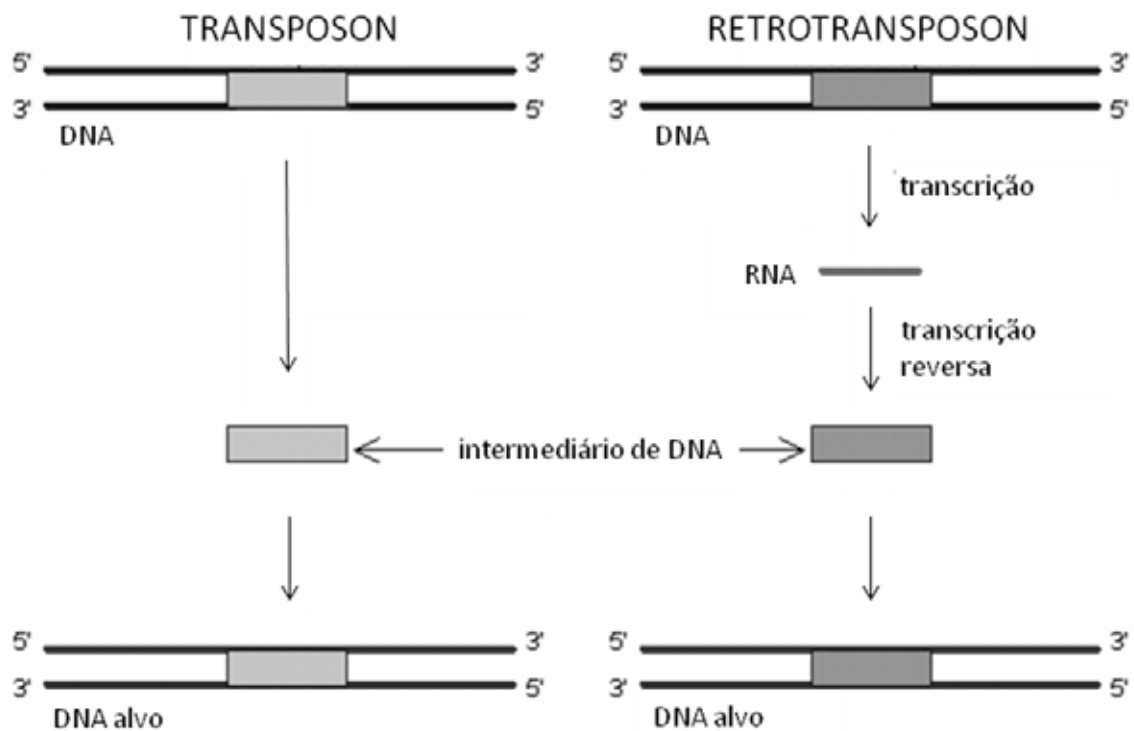
Inseridos no grupo de sequências repetitivas curtas e longas, encontram-se os elementos transponíveis (*Transposable Elements* - TEs), que correspondem a elementos móveis, ou seja, que possuem habilidade de se mover no genoma (Jurka et al., 2005). Dada a grande quantidade de elementos transponíveis em diferentes espécies, a identificação e caracterização destes segmentos se tornaram de grande importância para melhor compreensão de seu papel na organização e evolução do genoma (Feschotte, 2004; Böhne et al., 2008; Martins et al., 2011). Elementos transponíveis são particularmente abundantes em plantas, muitas vezes sendo um dos principais componentes do DNA nuclear. Em *Zea mays*, 49-78% do genoma é composto de retrotransposons (SanMiguel e Bennetzen, 1998). Em trigo, cerca de 90% do genoma consiste de sequências repetidas e, destas, 68% corresponde a elementos transponíveis (Li et al., 2004). Embora em proporções menores, elementos transponíveis também são encontrados em grande quantidade em vertebrados e invertebrados (Dombroski et al., 1994; Böhne et al., 2008; Bourque, 2009; Sela et al., 2010).

Diversos estudos vêm demonstrando que grande parte da diversidade encontrada entre os organismos pode ser creditada a uma importante característica dos TEs - sua capacidade de inserção e variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Feschotte e Pritham, 2007; Lankenau e Volff, 2009; Martins et al., 2011). Da mesma forma, o papel destes elementos em relação à manutenção, estrutura e funcionamento do genoma vem sendo também demonstrada em estudos envolvendo diferentes espécies (Slotkin e Martienssen 2007; Böhne et al., 2008; Sela et al., 2010).

## **1.8 Classificação dos elementos transponíveis**

Os elementos transponíveis podem ser agrupados em duas diferentes categorias, de acordo com a existência ou não de um intermediário de RNA durante o processo de

movibilidade no genoma. Elementos de origem retroviral e transposons que se locomovem via mecanismo de retrotransposição, ou seja, que transpõem por meio de uma cópia de RNA, compreendem os denominados retrotransposons ou elementos de classe I. As sequências com capacidade de transposição direta correspondem a elementos que transpõem por meio de uma cópia de DNA, denominados de transposons ou elementos de classe II (Charlesworth et al., 1994; Kazazian, 2004) (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema do processo de transposição de transposons (elementos transponíveis - classe II) e de retrotransposons (elementos transponíveis - classe I). Adaptado de Kumar e Bennetzen (1999).

Os transposons (classe II) são divididos em subclasses ou famílias de acordo com a similaridade entre as suas sequências e se encontram dispersos pelo genoma de procariontos e eucariotos (Feshotte e Prithman, 2007). Embora o mecanismo de transposição possa variar de um transposon para o outro, o mecanismo mais conhecido é o de “copiar e colar”, em que ocorre a duplicação do elemento levando ao surgimento de cópias que se inserem em novos locais (Figura 1). A sequência inicial se mantém no local original e, portanto, a transposição é acompanhada por um aumento no número de cópias do transposon. Pode ocorrer também a transposição não-replicativa em que não ocorre duplicação do transposon e o elemento

transponível se desloca diretamente de um local para outro mantendo suas características. Este último tipo de movimentação não favorece um aumento no número de cópias do transposon já que ele é retirado do local original (Lewin, 2004).

Os elementos transponíveis da classe I, ou retrotransposons, utilizam um mecanismo de transposição em que primeiro ocorre a transcrição completa do elemento, dando origem a uma cópia de RNA. Esta molécula codifica a enzima transcriptase reversa para que, a partir da molécula de RNA, origine-se uma nova fita de DNA, levando assim à formação de um intermediário híbrido DNA/RNA. A molécula de DNA utiliza outra enzima, a integrase, para se integrar em regiões dos cromossomos (Figura 1). Desde que a cópia original do cromossomo seja mantida no mesmo local original, este mecanismo causa uma duplicação. Desta forma, este processo é responsável pelo grande número de cópias de retroelementos presentes no genoma de diferentes espécies (Böhne et al., 2008).

Os retrotransposons podem ser divididos em duas subclasses: retrotransposons LTR (*Long Terminal Repeats*) e retrotransposons não-LTR (Volff et al., 2001; Eickbush e Malik, 2002). Os retrotransposons LTR requerem um maquinário complexo para transcrição e incorporação do elemento em outro local. Um dos exemplos clássicos de LTR possui longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3' que flanqueiam uma região central conhecida por ORF (*Open Reading Frame*). Uma das ORFs, denominada *gag*, produz uma poliproteína integrante do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease, transcriptase reversa, RNaseH e integrase (Figura 2). A última ORF, associada ao gene *env*, está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional associada ao envelope viral nos retrovírus (Böhne et al., 2008). Retrotransposons que não possuem repetições terminais longas são classificados como não-LTR (Figura 2) e podem ser divididos em duas superfamílias. A primeira inclui elementos que não codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa, precisando de outros elementos móveis para sua transposição, e tem como principal componente elementos curtos dispersos chamados de SINEs (*Short Interspersed Elements*). Na segunda superfamília estão os LINEs (*Long Interspersed Elements*), elementos que codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa (Böhne et al., 2008).



**Figura 2:** Esquema da organização geral de retrotransposons LTR e não-LTR. LTR, *Long Terminal Repeats*. *pol*, gene que codifica enzimas para transposição do elemento transponível. UTR, *Untranslated Region*. *orf*, *Open Reading Frame*. AAAAAAA, sequência poliadenilada terminal. Adaptado de Slotkin e Martienssen (2007).

### 1.9 Elementos retrotransponíveis da família *Rex*

Com o avanço dos projetos de sequenciamento, os elementos transponíveis vêm sendo considerados como um dos principais representantes do genoma de eucariotos. De maneira particular, os peixes têm chamado a atenção em relação à grande diversidade de classes de elementos transponíveis encontradas em seus genomas (Volf et al., 2003). As espécies *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis*, comumente utilizadas como modelos genéticos devido à compactação de seus genomas (cerca de 12% do genoma humano), apresentam cerca de 3 a 4% do seu DNA constituído por transposons (Aparicio et al., 2002; Jaillon et al., 2004). Porcentagem ainda maior - cerca de 7% - do genoma do peixe medaka (*Oryzias latipes*) é constituída por elementos transponíveis. Apesar da variedade de transposons que vêm sendo identificados em peixes, a caracterização destes em relação à sua sequência nucleotídica e a seu mapeamento físico foi somente realizada para um número reduzido de espécies até o momento (e.g. Ferreira et al., 2011; Valente et al., 2011).

Entre os diversos retroelementos encontrados em peixes, os retrotransposons da família *Rex* parecem ser abundantes em diferentes Teleósteos (Volf et al., 1999, 2000, 2001; Böhne et al., 2008). A denominação *Rex* (Retroelementos de *Xiphophorus*) refere-se a estes terem sido inicialmente isolados de melanoma de peixes deste gênero. *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram primeiramente isolados de uma região oncogene/proto-oncogene, envolvida na formação de melanoma, denominada *Xmrk* no cromossomo Y de *Xiphophorus* e correspondem a elementos retrotransponíveis que apresentam vasta distribuição e diferentes padrões de organização no genoma de várias espécies de peixes (Volf et al., 1999, 2001).

Segundo Volff et al. (2001), os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* correspondem a repetições não-LTRs que têm se mantido ativas durante a evolução de diferentes linhagens de peixes. O elemento transponível *Rex1* parece ser relacionado ao grupo *CR1* (*Chicken Repeat*), constituído por LINES, e codifica uma transcriptase reversa e uma endonuclease apurínica/apirimidínica necessária para clivagem da sequência alvo. *Rex3* é relacionado à família RTE (*Retrotransposable Element*) e, assim como *Rex1*, também codifica, além de uma transcriptase reversa, uma endonuclease apurínica/apirimidínica. *Rex6* também codifica uma transcriptase reversa e possui uma endonuclease similar a uma enzima de restrição (REL), sendo considerado similar aos membros da família R4 de transposons não-LTR que contêm os elementos Dong e R4 largamente encontrados em retroelementos de nemátodos e insetos (Volff et al., 2000).

Em peixes, estes três retrotransposons são atualmente os elementos retrotransponíveis mais estudados em relação à sua localização cromossômica, tendo sido fisicamente mapeados em algumas espécies de grupos distintos (e.g. Ferreira et al., 2011). Entretanto, frente à grande diversidade de peixes, o conhecimento sobre a organização destes elementos é ainda escasso. Desta forma, o isolamento e a caracterização destes e demais retrotransposons em um maior número de espécies de peixes e posteriores análises comparativas poderão fornecer contribuições à elaboração de um cenário mais abrangente acerca da origem, evolução e função destes elementos genômicos.

## 2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Considerando a relevância biológica e a importância econômica das espécies do gênero *Brycon* e que estudos acerca de elementos transponíveis em peixes ainda são escassos, o presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização nucleotídica e o mapeamento físico de retrotransposons da família *Rex* em *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyana*, de forma a fornecer subsídios à compreensão da organização e dinâmica evolutiva de elementos retrotransponíveis em peixes.

Objetivos específicos:

- Isolar segmentos de DNA correspondentes aos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* de *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyana* por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).
- Caracterizar o padrão de organização genômica dos retroelementos isolados por meio de sequenciamento nucleotídico e hibridação *in situ* cromossômica.
- Comparar os dados obtidos a informações sobre os padrões de organização genômica de retroelementos da família *Rex* disponíveis para outras espécies de peixes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Duas espécies de peixes do gênero *Brycon* - *B. amazonicus* (matrinchã da Amazônia) (Figura 3) e *B. orbignyanus* (piracanjuba) (Figura 4) (Characiformes, Bryconinae) - foram utilizadas como material de estudo. Os animais foram provenientes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais / Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBIO) (Pirassununga, SP). Todos os exemplares analisados foram submetidos às mesmas condições de manejo, densidade de estocagem e regime de alimentação - a densidade média de estocagem foi de 250g/m<sup>2</sup> e a temperatura média anual e a quantidade de oxigênio dissolvido na água foram de 26°C e 5.5 ppm, respectivamente.



**Figura 3:** Exemplar de *Brycon amazonicus* (matrinchã da Amazônia). Foto: Gilson Volpato.



**Figura 4:** Exemplar de *Brycon orbignyanus* (piracanjuba). Foto: Cláudio Timm.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA total foi realizada por meio de dois protocolos distintos, de acordo com o tipo de tecido utilizado. O isolamento de DNA de pedaços de nadadeiras caudal e/ou anal foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Wasko et al. (2003) e o isolamento de DNA de fígado, músculo ou brânquias foi realizado segundo a metodologia descrita em Sambrook e Russel (2001), com algumas alterações. Os protocolos encontram-se descritos a seguir.

Extração de DNA de nadadeira: Coletar 100-300 mg de nadadeira (1 a 2 cm<sup>2</sup>), com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça, e fixar o material em etanol 95% - 100 µM EDTA pH 8,0 em tubos de 1,5 mL. Secar o tecido em papel de filtro, para retirar o excesso de fixador, cortá-lo em pequenos pedaços e misturá-lo ao tampão de digestão TNES-uréia (Tris-HCl 10mM pH 8,0; NaCl 125 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5%; uréia 4 M) em um tubo de 15 mL. Adicionar 30 µL de RNase (10 mg/mL) e incubar a 42°C em banho-maria por 1 hora. Após este período, acrescentar 30 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e manter o tecido a 42°C em banho-maria por, no mínimo, 10 horas. Adicionar 4 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo. Inverter o tubo cuidadosamente por 15 minutos e centrifugá-lo a 10.000 rpm por 15 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta, remover o sobrenadante para outro tubo e precipitar o DNA em NaCl (1 M) e dois volumes de etanol absoluto gelado, invertendo o tubo diversas vezes. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e lavar o DNA em 1 mL de etanol 70%. Centrifugar o tubo a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, secar o DNA à temperatura ambiente ou em estufa a 37°C e ressuspender em 1 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). Depois de completamente dissolvido, manter o DNA a -20°C em tubos de 1,5 mL.

Extração de DNA de fígado, músculo ou brânquias: Coletar os tecidos desejados, com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça, e fixar o material em metanol:etanol (1:1) em tubos de 1,5 mL. Secar o tecido em papel de filtro, para retirar o excesso de fixador. Colocar pequenos pedaços de tecido em uma cubeta mantida no gelo e macerá-los em nitrogênio líquido, com auxílio de um pistilo. Adicionar 5 mL de solução de digestão (NaCl 0,4 M, EDTA 0,1 M pH 8,0, Proteinase K 100 µg/mL, SDS 0,1%) sobre o tecido já macerado. Manter o material em banho-maria a 50°C, em um tubo de centrífuga, durante 4 horas, agitando periodicamente. Adicionar fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) ao

material, em um volume igual ao da solução homogeneizada, e agitar os tubos suavemente durante 30 minutos. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 10 minutos e passar o sobrenadante, com o auxílio de uma micropipeta, para um outro tubo. Para a precipitação do DNA, acrescentar NaCl 1 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado e inverter o tubo diversas vezes. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante. Adicionar 100  $\mu$ L de etanol 70% ao tubo e centrifugá-lo a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartar novamente o sobrenadante e secar o DNA em estufa a 37°C. Depois de seco, dissolver o DNA em 1 mL de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Tratar a amostra com RNase (100  $\mu$ g/mL) a 37°C por 1 hora em banho-maria e novamente realizar o tratamento com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico para re-extração do DNA. Depois de precipitar o DNA, dissolvê-lo novamente em 1 mL de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e armazená-lo a -20°C em tubos de 1,5 mL.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1  $\mu$ L/mL) (Sambrook e Russell, 2001) e visualizado em transiluminador (Hofer UV-25), sob luz ultravioleta. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram também avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), por meio da comparação de absorbância a 260-280 nm.

### 3.2.2 Isolamento de sequências repetidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Diferentes conjuntos de *primers* foram utilizados para amplificar, por meio da técnica de PCR, elementos transponíveis já identificados e caracterizados em algumas espécies de peixes. Os retrotransposons *Rex1* (*primer* RTX1-F1: 5` TTC TTC AGT GCC TTC AAC ACC 3` e *primer* RTX1-R3: 5` TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC 3`), *Rex3* (*primer* RTX3-F3: 5` CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG 3` e *primer* RTX3-R3: 5` TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT 3`) (Volf et al., 1999, 2000, 2001) e *Rex6* (*primer* Rex6-Medf1: 5` TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC 3` e *primer* Rex6-Medr1: 5` GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG 3`) (Shimoda et al., 1996) foram amplificados via reação de PCR, como descrito a seguir:

Procedimento para a reação de PCR: 0,5  $\mu$ L de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) (10  $\mu$ M), 1,0  $\mu$ L de DNA total (100 ng), 2,5  $\mu$ L de tampão para *Taq* DNA polimerase (10x), 0,75

$\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 Mm), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (8 Mm), 0,1  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ ) e água milliQ autoclavada para completar um volume total de 25  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada com desnaturação inicial com temperatura de 95°C (5 minutos), seguida de desnaturação com temperatura de 95°C (40 segundos), anelamento com temperatura de 55°C (40 segundos), alongação com temperatura de 72°C (2 minutos) e uma extensão final a 72°C (5 minutos).

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5%, imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) (Sambrook e Russell, 2001), e submetidos à eletroforese a 110 V/150A. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta e a foto-documentação destes foi realizada com o programa computacional EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120 - Kodak Digital Science 1D). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com marcador de peso molecular conhecido. Posteriormente, os fragmentos de DNA de interesse foram submetidos à clonagem e sequenciamento.

### 3.2.3 Clonagem de fragmentos de DNA

A clonagem de fragmentos de DNA de interesse foi realizada para posterior caracterização de suas sequências nucleotídicas e utilização destes segmentos como sondas em experimentos de hibridação *in situ* cromossômica. Fragmentos de DNA de interesse foram ligados a plasmídeos específicos, seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente, foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  preparadas no próprio Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP).

Ligação em plasmídeos pGEM-T ou pGEM-T Easy (kit de ligação pGEM-T Vector System I ou pGEM-T Easy Vector System I - Promega): Em um tubo de 0,5 mL, adicionar 2  $\mu\text{L}$  do inserto de interesse (produto de DNA resultante de PCR), 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase, 1  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 10x, 1  $\mu\text{L}$  do plasmídeo (50 ng) e 5  $\mu\text{L}$  de água autoclavada. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12-16 horas.

Transformação de células competentes bacterianas: Colocar 50  $\mu\text{L}$  de bactérias competentes (acondicionadas a -70°C) em um tubo de 1,5 mL e, posteriormente, adicionar 10  $\mu\text{L}$  da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma

micropipeta. Manter o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37°C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950 µL de meio LB (Luria Bertani) líquido (peptona 1%, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5) à temperatura ambiente e incubar a 37°C por 1 hora, sob agitação a 225 rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5), contendo 2 µL de ampicilina (50 mg/mL) por mililitro de meio LB e 50 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-Dgalactoside) (50 mg/mL), para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C durante 12-16 horas.

A presença de insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por PCR e os clones recombinantes resultantes foram estocados em glicerol 70% e armazenados a -80°C.

### 3.2.4 Confirmação da presença de insertos nos clones obtidos

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR). Os *primers* M13F e M13R possuem homologia nas regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento no plasmídeo e, portanto, foram utilizados na reação, seguindo o protocolo descrito abaixo.

PCR para confirmação da presença de insertos: Em um tubo de 0,5 mL, adicionar uma fração de DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de uma ponteira estéril, 2,5 µL de tampão de PCR (10x), 0,5 µL de dNTPs (8 Mm), 0,5 µL de *primer* M13F (5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3') (10 µM), 0,5 µL de *primer* M13R (5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3') (10 µM), 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) e 20,5 µL de água autoclavada, totalizando um volume final de 25 µL. Realizar as reações de amplificação em termociclador com o seguinte programa: um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, para desnaturação, 34 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, seguidos de um passo final de alongação a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5%, imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1 µL/mL) (Sambrook e Russell, 2001) e submetido à eletroforese a 110 V/150A. Os produtos de

amplificação foram visualizados em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta e a foto-documentação destes foi realizada com o programa computacional EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120 - Kodak Digital Science 1D). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com marcador de peso molecular conhecido.

### 3.2.5 Mini-preparações para obtenção de plasmídeos recombinantes

Reações de mini-preparações (para retirada dos plasmídeos das bactérias) foram realizadas para posterior caracterização dos segmentos de DNA clonados e sua utilização como sondas em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente cromossômica. A metodologia refere-se à técnica de lise alcalina, descrita em Sambrook e Russell (2001), com pequenas alterações, conforme discriminado abaixo.

Crescimento das bactérias em meio de cultura líquido: Coletar, com o auxílio de uma ponteira ou palito de madeira estéril, colônias de bactérias recombinantes (colônias brancas) das placas de Petri. Colocar o material recolhido em tubos de 15 mL estéreis contendo 4 mL de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5). Manter os tubos a 37°C durante 12-16 horas, sob agitação a 225 rpm. Utilizar o material nas reações de mini-preparações.

Mini-preparações para obtenção de plasmídeos: Centrifugar 1,5 mL de meio de cultura em um tubo de 1,5mL estéril, por 15 segundos a 13.000 rpm. Retirar todo o sobrenadante com uma micropipeta e ressuspender o *pellet* em 100 µL de solução A gelada (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM). Adicionar 200 µl de solução B (SDS 1%, NaOH 0,2 M), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Adicionar 150 µL de solução C (acetato de potássio 5 M pH 4,8), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Centrifugar o tubo por 5 minutos a 13.000 rpm e transferir o sobrenadante, com uma micropipeta, para um outro tubo. Adicionar 0,5 mL de fenol:clorofórmio (1:1), misturar e centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm. Transferir a fase aquosa para outro tubo e adicionar dois volumes de etanol 100% gelado. Misturar invertendo o tubo cuidadosamente por dez vezes e deixar à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. Lavar o *pellet* com 100 µl de etanol gelado 70% e deixar secar à temperatura

ambiente ou em estufa a 37°C. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e armazenar a -20°C.

### 3.2.6 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer), seguindo as especificações dos fabricantes, como descrito a seguir:

Sequenciamento nucleotídico: Preparar a reação de sequenciamento contendo 2  $\mu\text{L}$  de *pré mix* (fornecido no kit), 2  $\mu\text{L}$  do produto purificado e 1  $\mu\text{L}$  de *primer* (10  $\mu\text{M}$ ). Realizar as reações em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Adicionar às amostras 2  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 4,5 mM e 80  $\mu\text{L}$  de etanol 95%. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 20°C. Remover o sobrenadante e adicionar 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Centrifugar novamente a 14.000 rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37°C por 1 hora, protegido da luz. Dissolver as amostras em solução de formamida e *blue dextran* (*Formamide Loading Dye* 5:2). Limpar a placa dupla de vidro com álcool, em que será colocado o gel de poliacrilamida. Colocar o pente na placa de vidro para formar os sulcos onde serão aplicadas as amostras de DNA. Colocar a placa em um forno de luz ultravioleta, inserir o gel de poliacrilamida (RapidGel<sup>TM</sup>-XL6% - GE Healthcare Life Sciences), com uma seringa, na placa dupla de vidro. Ligar a luz ultravioleta durante 3 minutos para polimerizar a poliacrilamida. Limpar novamente a placa de vidro, para evitar erros de leitura no sequenciamento. Colocar o gel no sequenciador automático e encher as cubas superior e inferior do sequenciador com tampão TBE 1x (Tris-Ácido bórico-EDTA). Desnaturar as amostras de DNA a 80°C por 4 minutos, em termociclador, e colocá-las imediatamente em gelo. Determinar a voltagem (1.400 V) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) no programa computacional e identificar as linhas de leitura com o número correspondente das amostras. Aplicar 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra em sua linha correspondente no gel. Iniciar a corrida do gel.

### 3.2.7 Análise das sequências nucleotídicas

Para identificação de possíveis homologias, as sequências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Posteriormente, as sequências nucleotídicas obtidas deverão ser depositadas no GenBank. O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). As sequências consenso foram determinadas com o programa Geneious Pro 4.5.5. (Drummond et al., <http://geneious.com>).

### 3.2.8 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para obtenção de cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica convencional de preparação direta (*air-drying*), descrita por Egozcue (1971) e por Cestari (1973) e posteriormente adaptada por Foresti et al. (1993). Em seguida à sua obtenção, as suspensões celulares foram aplicadas sobre lâminas de vidro. As metodologias utilizadas encontram-se descritas abaixo.

Obtenção de cromossomos mitóticos: Injetar solução aquosa de colchicina 0,025% (na proporção de 1 mL/100g de peso do animal) intra-abdominalmente, com uma seringa, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Manter os animais em aquário com bombeamento de ar, por um certo período de tempo (20 minutos a 2 horas). Sacrificar o animal para retirada, com o auxílio de tesoura e de pinças, o rim (anterior e/ou posterior). Lavar durante 30 segundos o material retirado em solução hipotônica (KCl 0,075 M) e transferi-lo para uma pequena cuba de vidro contendo 7mL desta mesma solução. Com o auxílio de pinças e de uma seringa de vidro desprovida de agulha, dissociar o material até obter uma suspensão celular homogênea. Transferir a solução obtida para um tubo de centrifuga e manter em estufa a 36-37°C, durante 25-30 minutos. Após este tempo, ressuspender a suspensão cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e descartar pedaços de tecido ainda não desfeitos. Acrescentar algumas gotas de fixador (álcool metílico 3:1 ácido acético) recém-preparado ao material e ressuspendê-lo novamente. Deixar à temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm e descartar o sobrenadante utilizando uma pipeta Pasteur. Acrescentar 5-7 mL de fixador recém-preparado, ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e centrifugar a 900 rpm por 15 minutos. Repetir o procedimento de fixação do material por mais duas vezes e, após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, adicionar 1 mL de fixador para ressuspender bem o material obtido. Guardar as

preparações celulares obtidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas em tubos de 1,5 mL, ou utilizá-las para preparação de lâminas.

Preparação de lâminas: Pingar 3-4 gotas da suspensão sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa e seca mantida sobre uma placa aquecida a  $38-39^{\circ}\text{C}$  ou sobre uma lâmina previamente mergulhada em água quente, formando assim uma fina camada de água sobre esta. Deixar o material secar à temperatura ambiente. Para verificar a qualidade e quantidade de metáfases, corar a lâmina com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,449 M pH 6,8) durante 7-8 minutos. Lavar a lâmina com água e deixar secar à temperatura ambiente.

As preparações cromossômicas foram analisadas em fotomicroscópio Olympus CX31, e fotografadas com o programa computacional Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.).

### 3.2.9 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Fragmentos de DNA de interesse (segmentos de retrotransposons *Rex*), isolados das espécies em estudo, foram utilizados como sondas em hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos. A metodologia utilizada, baseada em procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986) e em modificações apresentadas por Martins e Galetti (1999) e Wasko e Galetti (2000), encontra-se descrita a seguir.

Marcação da sonda: Marcar a sonda com biotina-11-dATP, por meio de *nick translation*, utilizando o kit Bionick<sup>TM</sup> Labelling System (Gibco), seguindo as especificações do fabricante - em um tubo de 1,5 mL, misturar 5  $\mu\text{L}$  de dNTP *mix* 10x, 1  $\mu\text{g}$  de DNA (sonda), 5  $\mu\text{L}$  de *mix* de enzima 10x e água autoclavada para completar 45  $\mu\text{L}$ . Incubar a solução a  $16^{\circ}\text{C}$  por 2 horas e, após este período, adicionar 5  $\mu\text{L}$  de tampão de parada, acetato de sódio 3 M a 1/10 do volume e dois volumes de etanol absoluto gelado. Misturar, invertendo o tubo por várias vezes, e manter a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 3 horas. Centrifugar o material a 13.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar 50  $\mu\text{L}$  de álcool 70% gelado. Centrifugar mais uma vez o material a 13.000 rpm por 5 minutos e secar em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Desnaturação da sonda: Ressuspender a sonda marcada em 80  $\mu\text{L}$  de água autoclavada e adicionar solução de formamida 50%, sulfato de dextrano 10% e 2xSSC (*Standard Saline Citrate*) ( $\text{NaCl}$  0,29 M,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0,029 M, pH 7,0). Desnaturar esta solução de hibridação em banho fervente por 10 minutos e transferi-la imediatamente para um recipiente com gelo.

Pré-tratamento das lâminas: Anteriormente à hibridação, pré-tratar as lâminas contendo preparações cromossômicas com solução de RNase (40 µg/mL em 2xSSC) durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, lavar as lâminas por 10 minutos em solução de 2xSSC por duas vezes e desidratá-las em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 10 minutos cada série, à temperatura ambiente.

Desnaturação dos cromossomos: Desnaturar as lâminas em formamida 70%/2xSSC por 5 minutos a 70°C. Posteriormente, desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada série, a -20°C.

Hibridação: Aplicar 40 µL da solução de hibridação (contendo 150-200 ng de sonda) sobre cada lâmina e cobrir com uma lamínula. Incubar durante 12-14 horas a 37°C em câmara úmida. Lavar as lâminas por duas vezes em solução de formamida 50%/2xSSC por 15 minutos a 37°C e posteriormente por mais duas vezes em 2xSSC por 15 minutos a 37°C. Realizar mais uma lavagem em 4xSSC por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Detecção dos sinais de hibridação: Sobre cada uma das lâminas, colocar 100 µL de FITC (Fluoresceína Isotilcianato) 0,07% conjugada à avidina e diluída em tampão C (bicarbonato de sódio 0,1 M e NaCl 0,15 M, pH 8,5). Cobrir com uma lamínula e incubar a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. Lavar as lâminas por 3 vezes (5 minutos cada vez) em tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 1,26%, citrato de sódio 0,018%, Triton 0,038% e leite desnatado 1%) a 42°C. Após a lavagem, colocar 100 µL de anticorpo anti-avidina biotinizada 2,5% sobre cada uma das lâminas, cobrir com lamínula, e mantê-las a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Realizar a lavagem das lâminas utilizando o mesmo tampão de bloqueio. O sinal de hibridação pode ser aumentado com sucessivos passos utilizando avidina-FITC e anti-avidina biotinizada.

Lavagem das lâminas: Lavar as lâminas por 3 vezes (5 minutos cada) em tampão de bloqueio a 42°C e posteriormente por duas vezes em solução de Triton 20/4xSSC por 3 minutos cada vez.

Contra-coloração das lâminas: Contra-corar as lâminas com 1 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) e 25 µL de solução *antifade* (Vectashield antifade-Vector).

As preparações cromossômicas submetidas à hibridação *in situ* fluorescente foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX61, com filtro 450-490 nm, e fotografadas com o programa computacional Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sequências nucleotídicas de retroelementos da família *Rex*

Amostras de 6 exemplares de *Brycon amazonicus* e de 5 exemplares de *B. orbignyanus* foram utilizadas em PCR para amplificação de elementos retrotransponíveis, utilizando *primers* já descritos na literatura. Fragmentos de aproximadamente 550, 500 e 510 pares de bases (pb) puderam ser visualizados em gel de agarose, para ambas espécies, potencialmente referentes aos retrotransposons denominados *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, respectivamente (Figura 5).

Após clonagem foi realizado o sequenciamento nucleotídico de 5 clones de cada fragmento amplificado e, sequências consenso foram geradas para cada uma das espécies em estudo (Figuras 6, 7 e 8) e estas foram utilizadas em análises comparativas com sequências depositadas em bancos de dados. Estas análises permitiram confirmar que os fragmentos isolados correspondem a segmentos de elementos transponíveis da família *Rex*. De modo geral, embora grande parte da sequência nucleotídica de cada um dos retroelementos em estudo mostre-se conservada em diferentes peixes, algumas variações puderam ser encontradas entre as sequências de *B. amazonicus*, *B. orbignyanus* e outras espécies, associadas principalmente a substituições de bases (transições e transversões) e também a deleções e duplicações.

Comparações entre as sequências nucleotídicas parciais analisadas de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* de *Brycon amazonicus*, *B. orbignyanus* e diversos outros peixes podem ser visualizadas nas Figuras 6, 7 e 8 e nas Tabelas 1, 2 e 3. Dados comparativos de cada um dos três retroelementos estudados indicam um maior nível de similaridade entre as sequências nucleotídicas de *Rex3* de diferentes espécies de peixes.

Os fragmentos associados ao retroelemento *Rex1* isolado de *Brycon amazonicus* e *B. orbignyanus* mostraram-se compostos por 554 pares de bases, tendo uma porcentagem de 52,63% e 53,62% de bases GC, respectivamente (Figura 6). A região amplificada de *Rex1* corresponde aos domínios codificantes 3-7 do gene da transcriptase reversa (RT), conforme descrito por Volff et al. (2000). Comparações entre as sequências nucleotídicas de *Rex1* das duas espécies do gênero *Brycon* evidenciaram uma similaridade de 75,6%. A Figura 6 evidencia, comparativamente, as sequências nucleotídicas parciais de *Rex1* das duas espécies em estudo e de outras espécies de peixes para as quais foram observados maiores níveis de similaridade.

Níveis altos de identidade com o elemento *Rex1* isolado de *B. amazonicus* puderam ser evidenciados para segmentos de DNA associados a este retrotransposon de distintas espécies de peixes, especialmente das famílias Loricariidae (75,6-83,9%), Cichlidae (72,1-76,6%), Anguillidae (75,1-75,6%), Nototheniidae (73,1-75,0%) e Poecillidae (70,1%), conforme

mostrado na Tabela 1. Em relação a *Rex1* isolado de *B. orbignyana*, foi encontrada uma maior identidade com este retroelemento descrito para espécies das famílias Cichlidae (86,9-98,7%), Anguillidae (79,1-80,1%), Fundulidae (78,7%), Nototheniidae (75,5-79,1%), Loricariidae (75,2-76,5%) e Poecillidae (71,8%) (Tabela 1). De modo geral, tanto *Rex1* de *B. amazonicus* como de *B. orbignyana* apresentaram maior identidade em suas sequências nucleotídicas com este retroelemento descrito para espécies das ordens Anguilliformes, Perciformes e Siluriformes (Tabela 1).

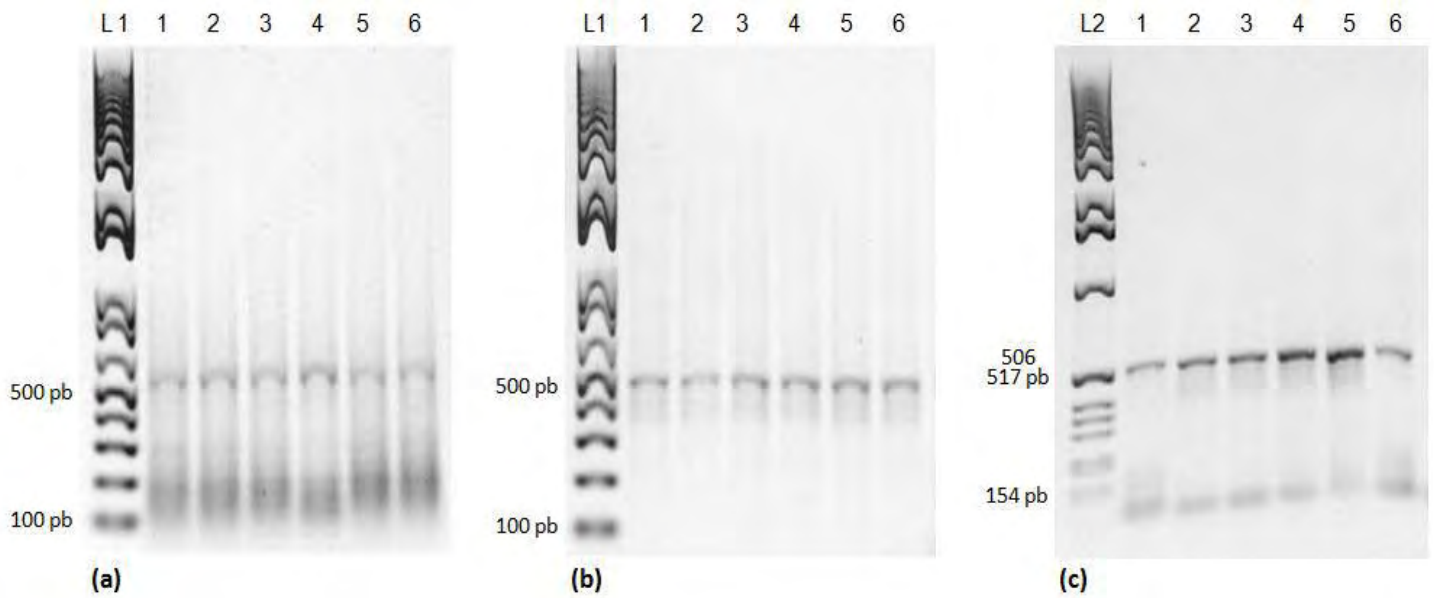
Os fragmentos de DNA relativos ao retroelemento *Rex3* isolados de *Brycon amazonicus* e *B. orbignyana* apresentaram-se compostos por 465 pares de bases, tendo um conteúdo de bases GC de 56,80% e 57,02%, respectivamente. Os segmentos amplificados correspondem aos domínios codificantes 1, 2, 2A, A e B do gene da transcriptase reversa (RT) (Volf et al., 1999). Comparações entre as sequências nucleotídicas de *Rex3* das duas espécies analisadas no presente estudo evidenciaram uma identidade de 84,08%. A Figura 7 e a Tabela 2 apresentam dados associados a *Rex3* de outras espécies de peixes para as quais foram identificados maiores níveis de similaridade em relação a este retroelemento isolado de *B. amazonicus* e *B. orbignyana*.

Quando comparado a sequências nucleotídicas do NCBI, o retrotransposon *Rex3* de *B. amazonicus* apresentou uma similaridade de 84,9% com este mesmo elemento retrotransponível de uma espécie da família Loricariidae, 82,3-84,4% de similaridade com *Rex3* de espécies da família Cyprinidae e 84,2% de identidade com este retroelemento de espécies das famílias Tetraodontidae, Esocidae e Polypteridae. Em relação a diferentes espécies de Anguillidae, Cichlidae, Percichthyidae e Poecillidae, foram observados valores de similaridade muito próximos, variáveis entre 80,6% e 82,8%. O retrotransposon *Rex3* isolado de *B. orbignyana* apresentou maiores níveis de identidade com elementos similares encontrados em espécies das famílias Cichlidae (89,6-99,0%), Tetraodontidae (85,8%), Cyprinidae (81,9-85,3%), Loricariidae (84,9%), Poecillidae (83,2-84,3%), Polypteridae (84,3%), Esocidae (83,1%) e Percichthyidae (81,1%) (Tabela 2). Os dados apresentados mostram que *Rex3* de *B. amazonicus* e *B. orbignyana* apresentam maior similaridade nucleotídica a retroelementos similares encontrados em espécies de vários grupos, como Anguilliformes, Cypriniformes, Cyprinodontiformes, Esociformes, Perciformes, Polypteriformes, Siluriformes e Tetraodontiformes (Tabela 2).

Em relação ao retroelemento *Rex6*, foi possível caracterizar um fragmento de 485 pares de bases isolado de *Brycon orbignyana* (Figura 8). Este fragmento, com um conteúdo de 51,34% de bases GC, codifica a porção C-terminal de uma endonuclease que possui ação similar à uma enzima de restrição (Volf et al., 2001). Dados associados a *Rex6* de espécies de peixes para as quais foram identificados maiores níveis de similaridade em relação a este retroelemento

isolado de *B. orbignyana* podem ser visualizados na Figura 8 e na Tabela 3. Maiores níveis de similaridade puderam ser observados entre *Rex6* de *B. orbignyana* e este retroelemento descrito para diferentes espécies da família Cichlidae (Perciformes) (73,5-84,1%), uma espécie de Beloniformes - *Oryzias latipes* (74,0%) - e diversas espécies da família Poecillidae (Cyprinodontiformes) (71,5-73,1%) (Tabela 3). Não foi possível obter sequências nucleotídicas de boa qualidade relativas a *Rex6* de *Brycon amazonicus*.

Única espécie da ordem Characiformes a figurar no NCBI com dados associados a sequências nucleotídicas de elementos *Rex*, *Erythrinus erythrinus* evidenciou um baixo nível de identidade de *Rex3* com este retroelemento isolado de *B. amazonicus* e *B. orbignyana*. Comparações entre a sequência parcial de *Rex3* descrita para *E. erythrinus* e este mesmo segmento de DNA de *B. amazonicus* e *B. orbignyana* mostram uma similaridade de 73,9% e 70,3%, respectivamente (Figura 9 e Tabela 2). As buscas NCBI não evidenciaram sequências nucleotídicas relativas aos retroelementos *Rex1* e *Rex6* para qualquer espécie de Characiformes.



**Figura 5:** Gel de agarose 1% evidenciando resultados de PCR associados à amplificação dos elementos retrotransponíveis *Rex1* (a), *Rex3* (b) e *Rex6* (c) de *Brycon orbignyanus* (1-3) e *Brycon amazonicus* (4-6). L1, marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder; L2, marcador de peso molecular 1Kb Extension Ladder (Invitrogen); pb, pares de bases.

```

BaRex1 TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTCATGCCTCTGTTGTACAGTTTGTACAGTCTGTTGTG
BoRex1 .....TGA..C..C....A..AGCA.-...-...
GQ505952 .....TG...T.-----...G....A..G...
GQ505953 .....GG...TCC-----...A....A..AG..A.
GQ505951 .....TGT...T.-----...A....A..CA...
AJ288470 -----
AJ288475 -----
AJ288478 -----
AJ288466 -----
AF155736 -----

BaRex1 TTTGTTGATCAGTCCAGATTGTTGTTTAGATGAACTCC-AGGTACTTGTAGGAGTCCACT
BoRex1 ---.C.--.....T..A..A..C..G....A..C.....C..A..A.....
GQ505952 ..AAC..C.....C....A....G....A..C.....A..A..A....
GQ505953 ..AAC..C.....AT....A....AG-...A..C.....ACA..A.....
GQ505951 ..GTCG..C.....T..TGTG..A..G....A..C.....ACT.....C
AJ288470 -----T..A....C..G....A..C.....A..A.....
AJ288475 -----T..A..A..C..G....A..C.....A..A.....
AJ288478 -----C..A..A..G....A..C.....A..A.....
AJ288466 -----T..A..A..C..G....A..C.....A..T..T...C
AF155736 -----T..T..A..A..C..G....A..C.....T..T...C

BaRex1 CTCTCAATCTCCATCCCCTGGATGTTCACTGA--TGG-AGGGGGGTG--TCCG-CATCTG
BoRex1 A.....G....CT.....C.G--.TC..T.T...GG..T.-.G...C
GQ505952 .....G..G....A.....-...-...AA..--CTT.-.C...
GQ505953 ..TG...G..T...TT.....T..A..--...-AA..TT...-..TT.-G....
GQ505951 A.G..G..G.....C.GTG.T.-.A..A....A---.CG-..A..A
AJ288470 A.....G....CT.....A....C.G--.TC..T.T...GG..A-.GC...
AJ288475 A.....G....CT.....C.G--.TC..T.T...GG..T.-.G...C
AJ288478 A.....G....CT.....T..C.G--.TC..T.T...GG..T.-.G...C
AJ288466 A.....T....T.....GTA.A.G...C.A--TTGTT.G..C..T
AF155736 A.....G....T.....GTA...G...A.AAGAGTGTTA..C..T

BaRex1 CGGGAATCCACCACCAGTCTCTTTGATCTTCCCCGCGTTTATCTGGAGGTGGTTCTGCAGA
BoRex1 ...A.G.....AC..C...G.T.....G....G....A.C....A.....C...
GQ505952 ...A.....G.....T.TA...A.....C....
GQ505953 ...A.T.....G...T..T.T...A..T..A....T.....
GQ505951 .AAA.....C..C...G.T....AAT...A.....C....A..AT..G
AJ288470 ...A.....C..C...G.T..AG.A....A..A.....C..T.G
AJ288475 ...A.G.....AC..C...G.T....G....G....A.C.....T.G
AJ288478 ...A.....AC..C...G.T....G.T...G...A.C.....T.G
AJ288466 ...A.G.....C..C...G.T....T..A..G.G....CA...CA.T.G
AF155736 ...A.G.....C..C...G.T....T.CA..G.G....C....A..T.G

BaRex1 CACCAGGCCACACAGTCCCTGAATCGGTTCTCTGTTCTCGCTGTCCCTCCTTAGTTCTG
BoRex1 .....T....A....A..G..CAC.G....A...TGA...G....ACCT..GA..
GQ505952 .....T....A..AA...T....A....A.....A....T..A..
GQ505953 .....TT...A...T....TA..C..T..A..TA.....T...A..G...A.A
GQ505951 .....T....A...T....ACC.G....AT..C.G...G....A..C..AAA..
AJ288470 .....T....A.....G..CA..G.C...A...TGC...A....A..CT..GA..
AJ288475 .....T....A....A..G..CAC.G....G...TGA...G....ACCT..GA..
AJ288478 .....T....A....A..G..CAC.....A...TGA...G....ACCT..GA..
AJ288466 .....AT....A..C...GG..A.A.....A...C.....G...C..A..CT..GA..R
AF155736 .....T....A..C...GG..A.A.....A...C.....G...C..A..CT..GA..

BaRex1 AGGCCGACAATCGTAGAGTCATCAGAGAACTTCTGGAGGTGACAG-----TGAGCTGTAC
BoRex1 .....T..G.C.....G.....T.....G...CGTGGG...T..ATG
GQ505952 .....T..G...CT.....A....A...TTCGG.....
GQ505953 .....CG.....A.....T.A.....GTCGG.....
GQ505951 ..A..A...CA.C.....T.....TTCAG.....
AJ288470 .....A..T.CG.C....G.....G....C..A..G...--CG-.G.GA..TG
AJ288475 .....T..G.C....G.....T.....G...--CG-.G.GA..TG
AJ288478 .....T..G.C....G.....G.....T.....G...--CG-.G.GA..TG
AJ288466 ..A..T...G..T.CG.....C.....G...TT-AG--CTGA..TG
AF155736 .....TG..T.C.....T.....G...TT-AG--CTGA..TG

```



```

BaRex3      CGGTGATAAAGGGCAGCCCTGACGGAGTCCAACCCCACTGAAAACCAGTCCGACTTATT
BoRex3      .....G....C...T.A....C.G....G.....G.....
AJ621035    .....C.....G.....GG...G...T.....C.
AJ400446    -----.....ATG....GG...A...T.....C.
AJ400452    -----.....A...T.....C.
AJ400382    -----.....T.T...C.G...TG..C.....C.
AJ400440    -----
GQ505956    -----
AJ400369    -----...C...T.A....CAG...G.....
HM535302    -----.....A.G...NG.....
AJ400374    -----.....A....A.G...G.A.....
FJ687588    -----.....A....A.G...G...N.N....
AF125981    .....C.....G.....T.T...C.G...G...C.....C.
AJ400383    -----.....T.T...C.G...A...C.....C.
AJ400400    -----.....T.T...C.G...G...C.....C.
AJ400366    -----.....A.G....G...A.A.T.....
AJ400456    -----
HM236164    ---...C.....G.....T.T....G...AGG.CTT..T..-C.

BaRex3      ACCGGCAATGCGGACCAGGCTCCTG-CTCC-GTTCGTATAGGGA-CTGGGTGGCCCATAG
BoRex3      G.....A....AA...T.A-..AA.G...-.....-TC.AA.....G...
AJ621035    G.....A....A...-...A.A..G...-...C..A..G...-ACA...-...-
AJ400446    G.....A....A.....-...T.G...-T..C....C...-ACA...T...
AJ400452    G.T.....A....A.....-...A...-...C....A...-A.A...-...-
AJ400382    G.....A...-...A.A..G...-...C....C...-ACA.....-
AJ400440    -.....A..ACA.....-...G...-A..C....C...-ACA...T...
GQ505956    -...C....A....AA-...A...GC...-...C....-...AA.....G...
AJ400369    G..A.....A....AA...T.A-..AA.G...-.....-TC.AA.....G...
HM535302    G.....N.....A....TC...G.A...-...C....-...AA.....GN.A
AJ400374    .....T..A.....A....TCA-..GTG...-...C.A...-...AA.....GC.A
FJ687588    G.....NA.....A....TC...G.G...-...C....-...AA.....GC.A
AF125981    G.....A...-...A.A..G...-...A..C....C...-ACA...G...T
AJ400383    G.....A...-...A.A..G...-...A..C....C...-ACA.....T
AJ400400    G.....A...-...A.A..G...-...A..C....C...-ACA...G...T
AJ400366    G....G....A....A....A...T-...A.GC.....-GA.AC.....-...
AJ400456    -----...T.A..AGA...TT...-...-AGTA..C....-C.AA...AA.GC.-
HM236164    G.....TTGA-..A..G...-...C....-C.AACA...T..T

BaRex3      TAA-A-GA-G-CC-ACATATCCCATATTCGGGAGCACTCCCCACAGGA-TACCACAAGG
BoRex3      C..-T-.G-...-G.C.C.....C.....C.A...CT.....-C...C.G...
AJ621035    ...C.G..G.C.G...-C...C.....T..C....G...C...-C.G...
AJ400446    C..-G-..-C-..GGAC-.....A....C.T....A...-G..G.G...
AJ400452    ...C.G-.G.G..CCGGAC-.....C.....C.....-C-G..G.G...
AJ400382    .C.A.G.-.-..C-GG..C.....C.....A..CN.....A.G-CC..C.TG..
AJ400440    C..AGG.-..-C..C-GG-.C.....C....A.....AAGC-G..C.GG..
GQ505956    ...-G-...-..TG..C.....C..G..A....C.T....AA...-...C.G...
AJ400369    C..-T-.G-...-G.C.C.....C.....C.A...CT.....-C...C.G...
HM535302    C..-C-.G-...-G.C.C.....C.....C....CT.....-N..C.G...
AJ400374    C..-C-.G-...-G.C.C.....C.....C.A..CT...A...-C...C.G...
FJ687588    C..-T-.G-...-G.C.C.....C.....C....CT.....-...C.G...
AF125981    C..-..G-...-CGG..C.....C.....A..C.....G-CT..C.G...
AJ400383    C..-..G-...-CGG..C.....C.....A..C.....A.G-CC..C.TG..
AJ400400    C..-..G-...-CGG..C.....C.....A..C.....G-CT..C.G...
AJ400366    C..C-..TTG...-T.TG.C.....C.....C....C.T.T...A...-G..G.G...
AJ400456    --.C.-.NNNNNNC-G.C.C..T.A.C...AC....CT....A...-...C.GG..
HM236164    C.-.-G.GG.T...-GG..C.....C.....C.....-T..C.G...

```

BaRex3 GACACGGTCAAATGCCTTCTCCAAATCCACAAAACACATGTGGACTGGTTGGGCAAACCTC  
 BoRex3 .....G.....G.....A.....  
 AJ621035 .....G.....T.....  
 AJ400446 .....T..G.....  
 AJ400452 .....TA.....T.....T.....  
 AJ400382 .....G..C.....N.....A..C.....G.....  
 AJ400440 C.....G.....G.....G.....  
 GQ505956 A...A..G.....G.....G.....A.....  
 AJ400369 .....G.....G.....A.....  
 HM535302 .....G.....G.....G.....AA...A..T.....  
 AJ400374 .....G.....G.....G.....A.....  
 FJ687588 .....G.....G.....N...G.....A.....A.....  
 AF125981 .....G..C.....G.....A.....G.....  
 AJ400383 .....TG..C.....G.....A..C.....G.....  
 AJ400400 .....G..C.....G.....A.....G.....  
 AJ400366 .....AA.....T..G.....C..T.....  
 AJ400456 A.....C..CT..C.....A..T...A.AA.....  
 HM236164 .....G..C.....T...G.....A.....

BaRex3 CCATGCGCCTCCAGGACCTGGC-GAGGGTAAAGAGCTGGTCCAGTGTCCACGGCCGG  
 BoRex3 .....A.....A..T..T...C.A-...A.....G..A..A.  
 AJ621035 .....A.....A.....-T.....GT.....C.....T..A.  
 AJ400446 .....AA.....AC...C.TA-.....T.....C.....  
 AJ400452 .....AA...T..C...C.-T.....T.A.T..T.....T.....A...  
 AJ400382 .....A.....-T.....GT.....A..A.  
 AJ400440 .....AA...N.NC...GATG-...A..T.....A...  
 GQ505956 .....AA...G...T...AA-...A.....A..A.  
 AJ400369 .....A.....A..T..T...C.A-...A.....G..A..A.  
 HM535302 .....C..C.A..G.AN.N...C.A-...A.N.....C.....A..A.  
 AJ400374 .....A.A..G.AT.T...T.A-...A.....C.....A..A.  
 FJ687588 .....C..A.A..N.AN.T...C.A-...A.....N...N..A..A.  
 AF125981 .....A.....C.-...GT.....G..A..A.  
 AJ400383 .....A.....CT-...GT.....A..A.  
 AJ400400 .....A.....C.-...GT.....A..A.  
 AJ400366 .....AA...G..C.....T-...T.....A.....C.  
 AJ400456 .....C.....A.AT.T.TGT.A-...A.....TGT.....AA..T.  
 HM236164 .....A.....TT..CT-A...GT.....C.....G..A..A.

BaRex3 GATGAAACCCGCATTGTTCTCCTGAATCCGAGATTGACTATGAGCCGACTCTCTTCT  
 BoRex3 ..C...A.....T.....G.....ACG.A..A.....C.T.  
 AJ621035 ..C...A..A..C.....T..G.....CC.G....C..C...  
 AJ400446 ..C...A..A..C.....G...T.....CG...T.T...C...  
 AJ400452 ..C...A..A.....A..G.....TG...A.T...C...  
 AJ400382 ..C...A..A..C..C..T.....G.....CC.A...C..C...  
 AJ400440 ..C...A..A.TC..C.....G.....CG.A..A.T...C...  
 GQ505956 ..C...T.....C.....A.....C.....  
 AJ400369 ..C...A.....T.....G.....ACG.A..AA...C.T.  
 HM535302 ..C...A.....N...G.....CG.A...C..C.T.  
 AJ400374 ..C...A.....T.....G.....ACG.A..C..C..C.T.  
 FJ687588 ..C...A...A.....T.....T..G.....AC..A...C..C.T.  
 AF125981 ..CA...G..A..C..C..T.....G.....CC.A...C.....  
 AJ400383 ..C...A..A..C..C..T.....G.....CC.A...C..C...  
 AJ400400 ..C...A..A..C..C..T...G.....G.....CC.A...C..C...  
 AJ400366 ..C...A.....G...T..G...A..C..TG...TC..C...  
 AJ400456 ..C.....TG.....A...T..G.C.A..C..CG...AA.GC.G.C.N.  
 HM236164 ..C...A..A..C.....G..T.....CC.A...C..C...

```

BaRex3      CCAGTACCCCGGCATAGACCTTTCCAGGGAGGCTGAGAAGTGTGATCCCCCTATAGTTTG
BoRex3      ....C....T.....T..C.....G.....G.....G.
AJ621035    .....T.A.....C.....G.....G.
AJ400446    ....A...T.....T..C..G.....G.
AJ400452    .....T.....T..C....C.....GAG.....G.....G.
AJ400382    ....G....T.A.....A.....T.AG.....C.....G..A..G.
AJ400440    .....T..A.....A..G.....T..G.GA..G.
GQ505956    .....T.....T..A.....A.....T..T..G..A..G.
AJ400369    ....C....T.....T..C.....G.....G.....G.
HM535302    ....C....T.....A..G.....G.....T.G.....G.
AJ400374    ....C....T.....A..G.....T.....G.A...G.
FJ687588    ....C....T.....A..G.....G.....G.....G.
AF125981    ....G....CT.A.....G.....T.AG.....C..T...A..G.
AJ400383    ....G....T.A.....A.....T.AG.....G.....G..A..G.
AJ400400    ....G....T.A.....G.....T.AG.....C..T...A..G.
AJ400366    ....A...TG.....T..C..C.....T...G.....G.
AJ400456    ....C..T.TTA.....T..C.....C...A..G...A...G..A..G.
HM236164    ....A....C.A.....T.....G.....T..G....--

BaRex3      AGCACACTCTCCGGTCCCCATTCTTAAAAAGGGGGACCACCACCCCGTCTGCCA 465
BoRex3      .A.....C.....T..C.....G.T..... 465
AJ621035    .A....TC.....C.....A.....G.....
AJ400446    .A....C.....C.....-----
AJ400452    .A.C...C.....C...G.....-----
AJ400382    .....C.....C..T....C.....-----
AJ400440    .A....C.....C.....-----
GQ505956    .A....C.....T.....A..C.....-.....
AJ400369    .A....C..T...T..C.....G.T.....-----
HM535302    .A....C.....C.....G.T.....T..N..T..
AJ400374    .....C.....T..C.....G.T.....-----
FJ687588    .....C....N..T..C.....G.TT...A-----
AF125981    .....C.....C..T..G..C.....A.....
AJ400383    .....C.....C..T....C.....-----
AJ400400    .....C.....T..N..T..G..C.....-----
AJ400366    .....C.....C.....T.....-----
AJ400456    .A....C.K..A....C.....T.....-----
HM236164    .A....C-----

```

**Figura 7:** Sequências nucleotídicas consenso de região parcial do elemento retrotransponível *Rex3* isolado de *Brycon amazonicus* (BaRex3) e *Brycon orbignyanus* (BoRex3) e demais sequências nucleotídicas deste retroelemento identificadas em outras espécies de peixes (AJ621035, *Tetraodon nigroviridis*; AJ400446, *Esox lucius*; AJ400452, *Cyprinus carpio*; AJ400382, *Poecilia formosa*; AJ400440, *Siniperca chuatsi*; GQ505956, *Corumbataia cuetae*; AJ400369, *Oreochromis niloticus*; HM535302, *Geophagus surinamensis*; AJ400374, *Cichlasoma labridens*; FJ687588, *Cichla kelberi*; AF125981, *Xiphophorus maculatus*; AJ400383, *Poecilia latipinna*; AJ400400, *Xiphophorus helleri*; AJ400366, *Danio rerio*; AJ400456, *Anguilla anguilla*; HM236164, *Polypterus ornatipinnis*). As sequências selecionadas para alinhamento nucleotídico apresentaram maiores níveis de similaridade em relação a *Rex3* de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* (Valor >75,0% para ambas espécies, com exceção das variações *Rex3b* e *Rex3c* de *Xiphophorus maculatus*. Vide Tabela 2).

BoRex6 AAAGCATACATGGAGCGCCACAACCAA-GTGTCCAGCAT-AGTATACAG-AAACATTTGT  
 HM535303 -----G...C...  
 AJ293545 -----  
 HM535301 -----G.N-.NC...  
 AJ293549 -----  
 FJ687589 ...A...N...T...N...G...NNN.T...C.G...N...  
 AB465503 .....T...-...G.TG-.AT.A...G...-...G...

BoRex6 GCCGAGTATGGCCTGGAAG-TCCCGAGG-TCAAAATGGGAGACGCC-CTAGGGTGGTT  
 HM535303 .....AA.....-.....T.....-...A.....G  
 AJ293545 -----T...-.....-.....A.....G  
 HM535301 .....A.....-.....N.A...NG...T.....-...A...N...  
 AJ293549 -----TC...-.....-.....A.....  
 FJ687589 .....NN-.N.N...G...N.A...N.N...-T...N...A.AA...N...  
 AB465503 ...A..A...AA.....ACC..-A...-.....A..A..-T..G.A.....A

BoRex6 GAGAATAATTGAA-CTAAGATCCCGTGGGACTTCAAGATACAGACGGACAAAATGGTGGT  
 HM535303 .....G.CC..G-.....T.....  
 AJ293545 .....G.CC..G-.....T.....C.....A.....C...  
 HM535301 .....CA..G-.....T.....C.....A.....GC.T...A...  
 AJ293549 .....CT.CA..G-.....T.....C.....A.....C.T...A...  
 FJ687589 ....NC..CN..GG.....NT.....N...C.....A..T.G.C.T...A...  
 AB465503 .....G.GA.GG-.A.....T.....C...C...T...T.GG....AA.

BoRex6 GGCTAACCAACCGGACATAGTGGTGTAGACAAGCAGAAGAAGACGGCCATAGTGATAAA  
 HM535303 .....A.....G.....CG...  
 AJ293545 .....G.....A.....G.....CG...  
 HM535301 .....C..A...G.G...N..N.G...AA.N.G...G...  
 AJ293549 .....C..A...G.G...A..A.G...AA.T.G.G...G...  
 FJ687589 ...G.....C..A...G.G...A..AGG...A.T.G...G...  
 AB465503 ...A.....A.....T..A...G.G..T..AG.AC...G..AA...G.T..G.GG.

BoRex6 TGTAGCCATACTGAATGACAGCAACATCAGGAAGAAGGAACACAAGGAGCTCTTGAAGTA  
 HM535303 .....GG.T.C.....T.....G..A...GGA...A...  
 AJ293545 .....GG.T.C.....T.....G..A...GGA...A.G  
 HM535301 C..T..A...CA.G...G.N.....G..A...GGAT..A...  
 AJ293549 CA.T..A...CA.G...G.....A.....G..A...TGAC..A...  
 FJ687589 C..T..G...CA.G...G.....TG..A...TGAT..A...  
 AB465503 ...G..AG.G.CA.GC..TG.A.....TG..A..A.GGA...A...

BoRex6 CCAAGGGCTCA-AGAA-----GATGTGGAGGATGAAG-----GTGGTCCCAGT  
 HM535303 .....G...GAGCTCGAGAG.....G...GTAACG.....C...  
 AJ293545 .....G...GAGCTCGAGAG.....G...GTAACC.....C...  
 HM535301 ...G.....G...GGAGCTGGAAG.....A.....GTAACG.....C...  
 AJ293549 -...-----GCTGGAAAG.....A.....GCAACA.....C...  
 FJ687589 ...T.....G...GCCAAGGGCTCA...-AA..AC-...G.AAGGA-T...AAAAT.A  
 AB465503 ...G..A...G...GAACTGGAGAAAGCC...AAG...GTGACA...G..T..

BoRex6 GGAAGCAGAGCACTAG-----GACTCCCAAGCTA-----GTGGCTCCAGCAGATCCC  
 HM535303 ..T..T.G.....GTGCGGT.....GGCGA.....  
 AJ293545 ..T..T.G.....GTGCAGT...CT.....ATCAA.....  
 HM535301 ..T..T.G..A...C.GGGCAGT...C...A..GGGAGA.....-T...  
 AJ293549 ..T..T.G..A...C.GGGCAGT...C...T.GGGAGA.....T...  
 FJ687589 ..TG.CTG.TA-.T.-.GAACACTCGGGG.AGT.ACCCCAA...A...T...  
 AB465503 ..T..TTG.....C.GGGCAGTA..C...C..GGAGGA.....A..A...A...

BoRex6 AGGAACAACATCCAAGAGATCTCTGTCCAGTAGAGCGCAGTCCGAGGAACAGCTGAGATA  
 HM535303 G...T...-G.....A.....TG.....A...  
 AJ293545 ...T...-.....A.....T.....T.A...  
 HM535301 T..N..G...-T.....NA.....TG.....A...  
 AJ293549 T...-.....A.....A.A.TG.....A...  
 FJ687589 T...T...-T.....A.....A.A.TG.....A...  
 AB465503 T...AG..C..-...CC...A...A.A.....G.T.....A...

```

BoRex6      CTGCGCAGGACCCTCAAGCTCCCAGGCCTCTGGTAGAGGACC 485
HM535303    .....-----
AJ293545    .....-----
HM535301    .....T.....TA.A....
AJ293549    .....-----
FJ687589    ...T.....
AB465503    .....

```

**Figura 8:** Sequência nucleotídica consenso de região parcial do elemento retrotransponível *Rex6* isolado de *Brycon orbignyanus* (BoRex6) e demais sequências nucleotídicas deste retroelemento identificadas em outras espécies de peixes (HM53303, *Melanochromis auratus*; AJ293545, *Oreochromis niloticus*; HM535301 *Crenicichla* sp.; AJ293549, *Cichlasoma labridens*; FJ687589 *Cichla kelberi*; AB465503, *Oryzias latipes*). As sequências selecionadas para alinhamento nucleotídico apresentaram maiores níveis de similaridade em relação a *Rex6* de *B. orbignyanus* (Valor  $\geq 74,0\%$ . Vide Tabela 3).

```

BaRex3 AAACCAGTCCGACTTATTACCGCAATGCGGACCAGGCTCCTG-CTCCGTTCGTATAGGG
BoRex3 ....G.....G.....A...AA...T.A-.AA..G.T.....
GU989321 ....AGA.TG.....C.G.A....TACT.A.....A....GTG...T...T...C...-

BaRex3 ACTGGGTGGCCCATAGTAA-AGAG-CCACATATCCCATATTCGGGAGCACTCCCCACAG
BoRex3 .TC.AA.....G...C.G-T.G.-...G.C.C.....C.....C.A...CT.....
GU989321 .....A.A..T.G..ACG.A....C...-G..C.....C.....A.....C.....

BaRex3 GATACCACAAGGGACACGGTCAAATGCCTTCTCAAATCCACAAAACACATGTGGACTGG
BoRex3 ..C...C.G.....G.....G.....A.....
GU989321 A....C.G.....G.....G.....--.....

BaRex3 TTGGGCAAACCTCCCATGCGCCCTCCAGGACCCTGGCGAGGGTAAAGAGCTGGTCCAGTGT
BoRex3 .....A.....A..T..T...C.A...A.....
GU989321 ...A.....A.....T..A.....T...

BaRex3 TCCACGGCCGGGAT--GAAACCCGCATTGTT-CC-TCC-TGAA-TCCGAGATTG-ACTA
BoRex3 ...G..A..A..C--...A.....-...-...T.-.....G...-....
GU989321 .....A.....GGCG...T..GA.....T..C...C..G.T.....CG...AA....

BaRex3 --T---GAGCCGACTCTCTTCT-CCA-G-TA-CCCCGGCAT--AGA-CCTTTCAGGGA
BoRex3 A-----CG.A..A.....C.T.-...-C.-...T.....-...T..C.....
GU989321 AT.CAA..T.G.....T...A.T..A....CC...TT.A.A..C..TA.CC.G

BaRex3 GG----CT--GAGAAGTGTGA-TCCCCCTATAGTTTG-AG-CACACTCTCCGGT-CCCCA
BoRex3 ..----..--...G.....G.....G...A-...C.....-T..C
GU989321 ..GAAGG.TA.....T.....A.....TATTG...G.AA.....C..T..A.T....C

BaRex3 --TTCTT-AAAAAGGGGG-ACC 406
BoRex3 --.....-...G.T.....-... 406
GU989321 CC..T..G.....A... 438

```

**Figura 9:** Sequências nucleotídicas consenso de um segmento do elemento retrotransponível *Rex3* isolado de *Brycon amazonicus* (BaRex3) e *Brycon orbignyanus* (BoRex3) e de *Rex3* isolado de *Erythrinus erythrinus* (GU989321, Cioffi et al., 2010).

**Tabela 1:** Níveis de similaridade entre o elemento *Rex1* isolado de *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyana* e sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI.

Espécie	Família	Ordem	Elemento transponível	Nº de acesso no Gene Bank	Nível de similaridade	
					<i>Brycon amazonicus</i>	<i>Brycon orbignyana</i>
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguillidae	Anguilliformes	<i>Rex1</i>	AF155736	75,1%	79,1%
<i>Anguilla japonica</i>			<i>Rex1</i>	AJ288466	75,6%	80,1%
<i>Fundulus sp.</i>	Fundulidae	Cyprinodontiformes	<i>Rex1</i>	AJ288485	69,5%	78,7%
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Poeciliidae		<i>Rex1</i>	AJ288447	70,1%	71,8%
<i>Astronotus ocellatus</i>	Cichlidae	Perciformes	<i>Rex1</i>	HM535304	72,1%	86,9%
<i>Cichla kelberi</i>			<i>Rex1</i>	FJ687587	73,5%	88,8%
<i>Cichlasoma labridens</i>			<i>Rex1</i>	AJ288470	76,6%	91,4%
<i>Hemichromis bimaculatus</i>			<i>Rex1</i>	AJ288478	75,7%	95,7%
<i>Oreochromis niloticus</i>			<i>Rex1</i>	AJ288475	75,7%	98,7%
<i>Dissostichus mawsoni</i>			Nototheniidae	<i>Rex1</i>	AY331101	75,0%
<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Rex1</i>	AY331095		73,3%	77,9%	
<i>Trematomus newnesi</i>	<i>Rex1</i>	AY331098		73,1%	79,1%	
<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Loricariidae	Siluriformes	<i>Rex1</i>	GQ505952	83,9%	76,5%
<i>Otocinclus flexilis</i>			<i>Rex1</i>	GQ505951	75,6%	76,4%
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>			<i>Rex1</i>	GQ505953	80,3%	75,2%

**Tabela 2:** Níveis de similaridade entre o elemento *Rex3* isolado de *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyianus* e sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI.

Espécie	Família	Ordem	Elemento transponível	Nº de acesso do Gene Bank	Nível de similaridade	
					<i>Brycon amazonicus</i>	<i>Brycon orbignyianus</i>
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguillidae	Anguilliformes	<i>Rex3</i>	AJ400456	80,6%	78,6%
<i>Erythrinus erythrinus</i>	Erythrinidae	Characiformes	<i>Rex3</i>	GU989321	73,9%	70,3%
<i>Cyprinus carpio</i>	Cyprinidae	Cypriniformes	<i>Rex3</i>	AJ400452	84,4%	85,3%
<i>Danio rerio</i>			<i>Rex3</i>	AJ400366	82,3%	81,9%
<i>Poecilia formosa</i>	Poeciliidae	Cyprinodontiformes	<i>Rex3</i>	AJ400382	81,8%	83,9%
<i>Poecilia latipinna</i>			<i>Rex3</i>	AJ400383	81,4%	83,4%
<i>Xiphophorus helleri</i>			<i>Rex3</i>	AJ400400	81,8%	84,2%
<i>Xiphophorus maculatus</i>			<i>Rex3</i>	AF125981	82,8%	84,3%
<i>Xiphophorus maculatus</i>			<i>Rex3b</i>	AF125982	81,7%	84,3%
<i>Xiphophorus maculatus</i>			<i>Rex3c</i>	AF125983	81,7%	83,2%
<i>Esox lucius</i>	Esocidae	Esociformes	<i>Rex3</i>	AJ400446	84,2%	83,1%
<i>Cichla kelberi</i>	Cichlidae	Perciformes	<i>Rex3</i>	FJ687588	82,4%	89,6%
<i>Cichlasoma labridens</i>			<i>Rex3</i>	AJ400374	81,4%	89,9%
<i>Geophagus surinamensis</i>			<i>Rex3</i>	HM535302	82,2%	89,7%
<i>Oreochromis niloticus</i>			<i>Rex3</i>	AJ400369	82,5%	99,0%
<i>Siniperca chuatsi</i>			Percichthyidae	<i>Rex3</i>	AJ400440	82,2%
<i>Polypterus ornatipinnis</i>	Polypteridae	Polypteriformes	<i>Rex3</i>	HM236164	84,2%	84,3%
<i>Corumbataia cuestasae</i>	Loricariidae	Siluriformes	<i>Rex3</i>	GQ505956	84,9%	84,9%
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	<i>Rex3</i>	AJ621035	84,2%	85,8%

**Tabela 3:** Níveis de similaridade entre o elemento *Rex6* isolado de *Brycon orbignyana* e sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI.

Espécie	Família	Ordem	Elemento transponível	Nº de acesso no Gene Bank	Nível de similaridade
					<i>Brycon orbignyana</i>
<i>Oryzias latipes</i>	Adrianichthyidae	Beloniformes	<i>Rex6</i>	AB465503	74,0%
<i>Poecilia formosa</i>	Poeciliidae	Cyprinodontiformes	<i>Rex6</i>	AJ293538	73,1%
<i>Heterandria bimaculata</i>			<i>Rex6</i>	AJ293539	72,6%
<i>Poeciliopsis gracilis</i>			<i>Rex6</i>	AJ293523	72,4%
<i>Gambusia affinis</i>			<i>Rex6</i>	AJ293529	72,2%
<i>Xiphophorus maculatus</i>			<i>Rex6</i>	AJ293517	71,5%
<i>Astronotus ocellatus</i>			Cichlidae	Perciformes	<i>Rex6</i>
<i>Cichla kelberi</i>	<i>Rex6</i>	FJ687589			76,0%
<i>Cichlasoma labridens</i>	<i>Rex6</i>	AJ293549			78,1%
<i>Crenicichla</i> sp.	<i>Rex6</i>	HM535301			78,0%
<i>Melanochromis auratus</i>	<i>Rex6</i>	HM535303			84,1%
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Rex6</i>	AJ293545			83,0%

## 4.2 Localização cromossômica de retroelementos da família *Rex*

Com o propósito de verificar a distribuição de elementos da família *Rex* em espécies de *Brycon*, cromossomos metafásicos de diferentes exemplares de *B. amazonicus* e *B. orbignyianus* foram obtidos, evidenciando um número diplóide de 50 cromossomos (Figura 10). Lâminas que continham maior número de metáfases de melhor qualidade foram posteriormente utilizadas em experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando fragmentos de DNA correspondentes aos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* como sondas. De forma a comprovar a eficiência da técnica de FISH, controles positivos utilizando sonda de DNAr 18S isolado de *Brycon amazonicus* foram realizados, evidenciando marcações fluorescentes na região terminal do braço longo de dois cromossomos submetacêntricos de maior tamanho para ambas espécies (Figura 11). A distribuição dos sítios de DNAr 18S corresponde ao padrão já descrito para *B. amazonicus* e *B. orbignyianus* (Wasko e Galetti, 2000).

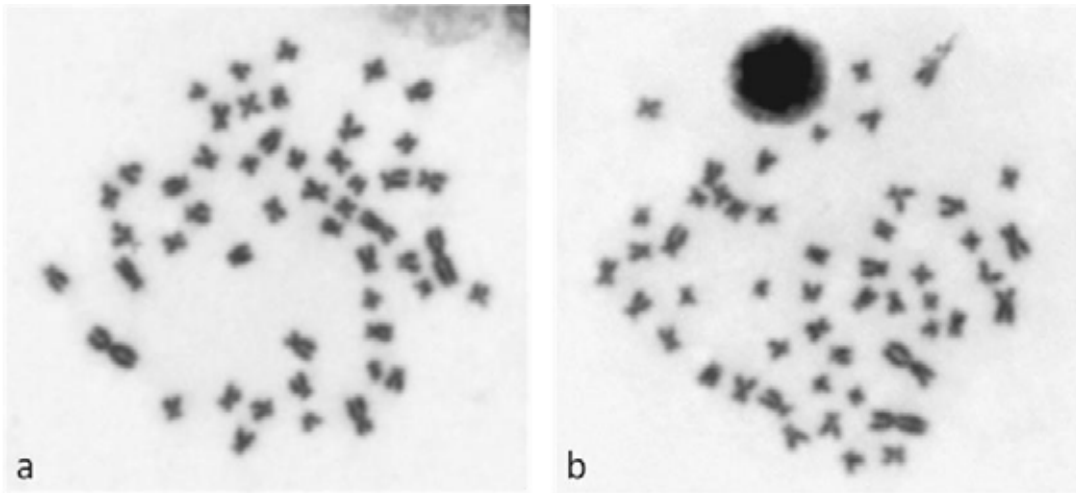
Nenhuma marcação fluorescente de grande intensidade foi detectada em sítios específicos dos cromossomos de *B. amazonicus* e *B. orbignyianus* por meio de hibridações com sondas correspondentes a segmentos de *Rex1* e *Rex3*; somente marcações de menor intensidade puderam ser visualizadas. Em relação a *Rex6*, não foi observada qualquer marcação fluorescente, mesmo de pequena intensidade, nos cromossomos de ambas espécies em estudo. A ausência de grandes sítios de elementos *Rex1* e *Rex3* em regiões específicas dos cromossomos e a total ausência de sinais de hibridação associados a *Rex6* em *B. amazonicus* e *B. orbignyianus* foram observadas independentemente de alterações nos protocolos de marcação da sonda e de hibridação, especialmente relacionadas à quantidade de sonda utilizada, condições de estringência e amplificação do sinal de hibridação.

Sinais fluorescentes dispersos e fracos, associados a *Rex1* e *Rex3* puderam ser visualizados em posições intersticiais dos braços curtos e longos de diversos cromossomos, especialmente em regiões pericentroméricas (Figura 12). Marcações fluorescentes foram também detectadas, de modo disperso, em núcleos interfásicos (Figura 12 b, c). Os resultados indicam que *Rex1* e *Rex3* apresentam um padrão de localização cromossômica do tipo disperso ao longo de diversos cromossomos. Além disso, repetições *Rex1* apresentaram-se mais evidentes e localizadas em regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns pares cromossômicos (Figura 12 a, c).

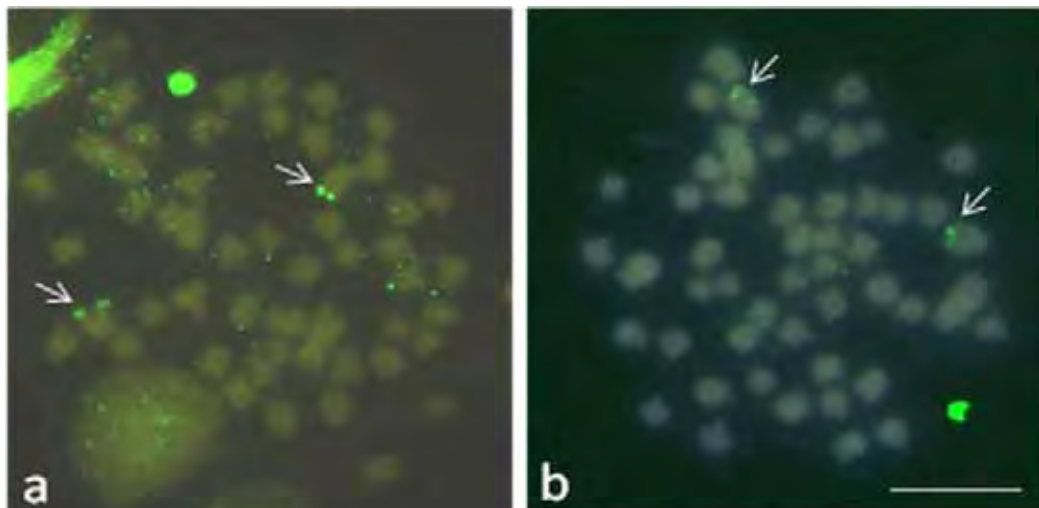
Um levantamento de dados acerca do mapeamento físico cromossômico de retrotransposons da família *Rex* indicou que, até o momento, foram descritos os padrões de

localização cromossômica destes elementos em 35 espécies de peixes (Tabela 4). O padrão de distribuição de repetições *Rex1* e *Rex3* nos cromossomos de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* é similar ao observado em outras espécies de peixes, como *Erythrinus erythrinus* (Cioffi et al., 2010), *Eigenmania* sp.2 (Sene, 2011), *Chaetobranchus flavescens* (Valente et al., 2011), *Cichla kelberi* (Teixeira et al., 2009), *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al., 2011; Fantinatti et al., 2012), *Stanoperca jurupari* (Valente et al., 2011) e *Notothenia coriiceps* (Ozouf-Costaz et al., 2004), em que estes elementos encontram-se, de modo geral, dispersos nos cromossomos, além de agrupados em regiões heterocromáticas pericentroméricas de alguns cromossomos (Tabela 4).

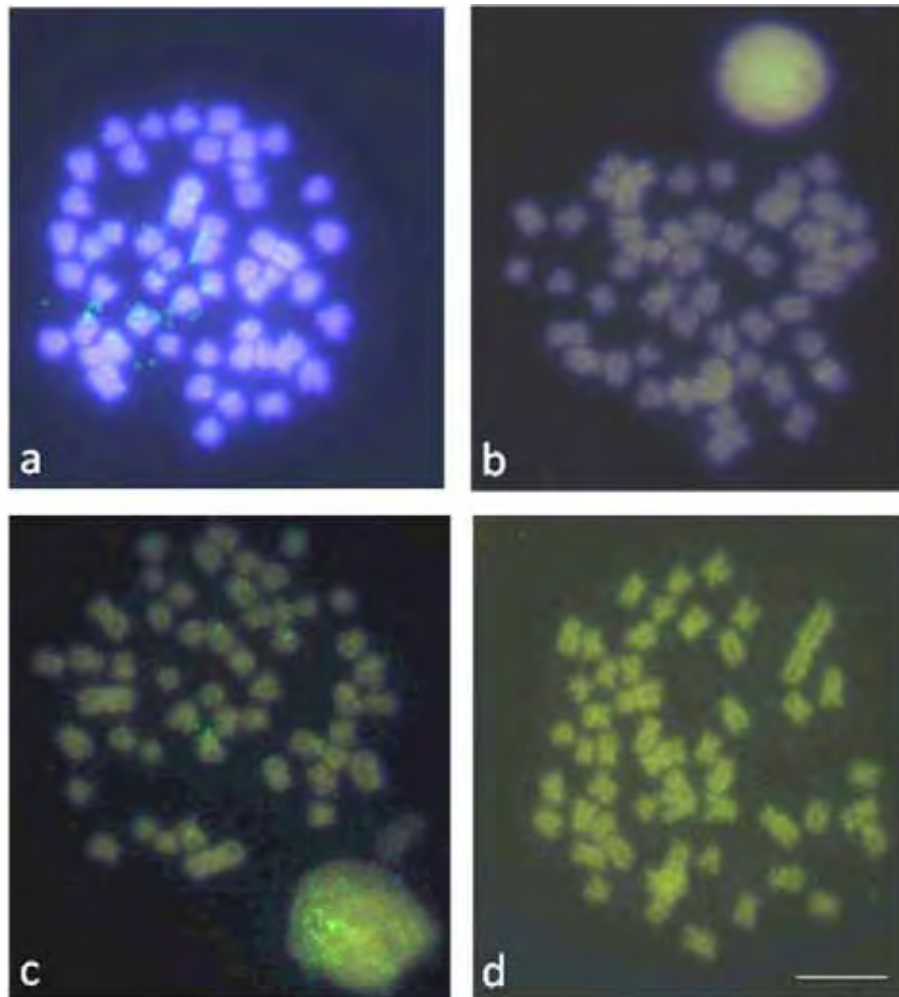
Embora sítios de *Rex6* dispersos e/ou associados a regiões de heterocromatina tenham sido identificados em ciclídeos, como *Astronotus ocellatus*, *Cichla kelberi*, *Chaetobranchus flavescens*, *Astatotilapia latifasciata*, *Hemichromis bimaculatus*, *Herus efasciatus*, *Malenochromis auratus*, *Oreochromis niloticus* e *Satanoperca jurupari* (Mazzuchelli e Martins, 2009; Teixeira et al., 2009 Valente et al., 2011), este retroelemento não pôde ser localizado nos cromossomos de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* com a técnica de FISH utilizada.



**Figura 10:** Cromossomos metafásicos de *Brycon amazonicus* (a) e *Brycon orbignyanus* (b). Coloração Giemsa.



**Figura 11:** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Brycon orbignyanus* (a) e *Brycon amazonicus* (b) utilizando como sonda um fragmento de DNAr 18S isolado de *B. amazonicus*. As setas indicam os sítios deste DNA ribossomal. Barra = 3 $\mu$ m.



**Figura 12:** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de *Brycon orbignyanus* (a, b) e *Brycon amazonicus* (c, d). Fragmentos de DNA correspondentes aos retrotransposons *Rex1* (a, c) e *Rex3* (b, d) foram utilizados como sondas. Barra = 3 $\mu$ m.

**Tabela 4:** Padrão de distribuição cromossômica de retrotransposons da família *Rex* em espécies de peixes.

Espécie	Família	Ordem	Elemento transponível	Localização cromossômica	Referência
<i>Brycon amazonicus</i>	Characidae	Characiformes	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso ( <i>Rex1</i> e <i>Rex3</i> ) regiões heterocromáticas pericentroméricas ( <i>Rex1</i> )	Presente trabalho
<i>Brycon orbignyianus</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso ( <i>Rex1</i> e <i>Rex3</i> ) regiões heterocromáticas pericentroméricas ( <i>Rex1</i> )	Presente trabalho
<i>Erythrinus erythrinus</i>	Erythrinidae		<i>Rex3</i>	disperso regiões heterocromáticas centroméricas e pericentroméricas	Cioffi et al. (2010)
<i>Eigenmania</i> sp.1	Sternopygidae	Gymnotiformes	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Sene (2011)
<i>Eigenmania</i> sp.2			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso regiões heterocromáticas	Sene (2011)
<i>Eigenmania</i> cf. <i>trilineata</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Sene (2011)
<i>Eigenmania</i> <i>virescens</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Sene (2011)
<i>Artedidraco shackletoni</i>	Artedidraconidae	Perciformes	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Bathydraconidae		<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Gymnodraco victori</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Bovichtus angustifrons</i>	Bovichtidae		<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Chionodraco hamatus</i>	Channichthyidae		<i>Rex1, Rex3</i>	disperso cromossomo Y	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Neopagetopsis ionah</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Astatotilapia latifasciata</i> (identificada como <i>Haplochromis obliquidens</i> )	Cichlidae		<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas par no. 1	Valente et al. (2011)
<i>Astatotilapia latifasciata</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas par no. 1 cromossomo supernumerário	Fantinatti et al. (2012)
<i>Astronotus</i>		<i>Rex1, Rex3,</i>	regiões heterocromáticas	Mazuchelli e Martins	

<i>ocellatus</i>	Cichlidae	Perciformes	<i>Rex6</i>	pericentroméricas	(2009)
<i>Chaetobranchus flavescens</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas	Valente et al. (2011)
<i>Cichla kelberi</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas regiões eucromáticas	Teixeira et al. (2009)
<i>Hemichromis bimaculatus</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	regiões heterocromáticas pericentroméricas	Valente et al. (2011)
<i>Heros fasciatus</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	regiões heterocromáticas pericentroméricas	Valente et al. (2011)
<i>Melanochromis auratus</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	regiões heterocromáticas pericentroméricas	Valente et al. (2011)
<i>Oreochromis niloticus</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas par no. 1	Valente et al. (2011)
<i>Satanoperca jurupari</i>			<i>Rex1, Rex3, Rex6</i>	disperso regiões heterocromáticas pericentroméricas	Valente et al. (2011)
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>			<i>Rex3</i>	regiões heterocromáticas pericentroméricas	Gross et al. (2009)
<i>Symphysodon discus</i>			<i>Rex3</i>	regiões heterocromáticas	Gross et al. (2009)
<i>Symphysodon haraldi</i>			<i>Rex3</i>	regiões heterocromáticas	Gross et al. (2009)
<i>Dissostichus mawsoni</i>	Nototheniidae		<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Notothenia coriiceps</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso ( <i>Rex1</i> ) regiões heterocromáticas pericentroméricas ( <i>Rex3</i> )	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Patagonotothn tessellata</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Trematomus bernacchii</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Trematomus hansonii</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Trematamus newnesi</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)
<i>Trematomus pennellii</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz et al. (2004)

<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Loricariidae	Siluriformes	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ferreira et al. (2011)
<i>Paratocinclus maculicauda</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ferreira et al. (2011)
<i>Paratocinclus tientensis</i>			<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ferreira et al. (2011)
<i>Steindachneridion melanodermatum</i>	Pimelodidae		<i>Rex3</i>	regiões heterocromáticas	Matoso et al. (2011)
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	<i>Rex1, Rex3</i>	regiões heterocromáticas	Silva et al. (2002), Bouneau et al. (2003), Fischer et al. (2004)

## 5 DISCUSSÃO

Os retrotransposons da família *Rex*, primeiramente isolados de *Xiphophorus*, correspondem a repetições não-LTRs que têm se mantido ativas durante a evolução de diferentes linhagens de peixes (Volff et al., 2000). Com base em suas estruturas, Volff et al. (1999, 2000, 2001), evidenciaram que o retroelemento *Rex1* é correlacionado a LINES *CR1* (*Chicken Repeat*) - encontrados no genoma de invertebrados (Drew e Brindley, 1997), peixes (Poulter et al., 1999), anfíbios (Vandergon e Reitman, 1994), répteis (Kajikawa et al., 1997) e mamíferos (Jurka, 2000) - e que *Rex3* é correlacionado à família RTE (*Retrotransposable Element*), primeiramente identificada em *Caenorhabditis elegans* (Youngman et al., 1996) e largamente distribuída em vertebrados e artrópodos (Malik e Eickbush, 1999). *Rex6* é considerado similar aos membros da família R4 de transposons não-LTR, primeiramente descritos em *Ascaris lumbricoides*, largamente distribuídos em nemátodos e insetos (Burke et al., 1995). Visando ampliar os dados acerca destes elementos repetitivos no genoma dos peixes, o presente trabalho resultou na caracterização nucleotídica e no mapeamento físico cromossômico de retrotransposons da família *Rex* em duas espécies de Characiformes - *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyanus* - grupo para o qual existem dados extremamente escassos acerca destas repetições não-LTR. Além disso, os resultados obtidos foram comparados a dados disponíveis na literatura e em bancos de dados do NCBI, permitindo elaborar um melhor cenário acerca de sua origem, evolução e organização genômica.

Os conjuntos de *primers* utilizados para amplificação de segmentos dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* mostraram-se eficientes para o isolamento de fragmentos de DNA de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus*, reiterando que estes podem ser aplicados com sucesso em diferentes grupos de peixes (Shimoda et al., 1996; Volff et al., 1999, 2000, 2001). Os fragmentos amplificados de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* mostraram tamanhos similares a segmentos correspondentes a estes três retrotransposons que também foram isolados de outras espécies de peixes utilizando os mesmos conjuntos de *primers* (Volff et al., 1999; Capriglione et al., 2002; Ozouf-Coastaz et al., 2004; Mazzuchelli e Martins, 2009; Gross et al., 2009; Teixeira et al., 2009; Cioffi et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Valente et al., 2011).

Inicialmente isolados de espécies do gênero *Xiphophorus*, os retrotransposons *Rex* foram posteriormente também identificados em outras espécies de peixes e parecem ser abundantes em diferentes Teleósteos, tendo sido caracterizados em espécies de distintas famílias, como Anguillidae, Cichlidae, Cyprinidae, Erythrinidae, Loricariidae, Poeciliidae, Nototheniidae e Tetraodontidae (Volff et al., 1999; Capriglione et al., 2002; Ozouf-Coastaz et al., 2004;

Mazzuchelli e Martins, 2009; Gross et al., 2009; Teixeira et al., 2009; Cioffi et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Valente et al., 2011). O isolamento dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em *B. amazonicus* e *B. orbigyanus* amplia os dados relativos à presença destes elementos em Characiformes, dado que somente *Rex3* havia sido identificado em uma única espécie deste grupo - *Erythrinus erythrinus* (Cioffi et al., 2010). Além disso, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, a ocorrência de tais elementos em espécies da família Characidae, fornecendo assim maior embasamento à proposição de Volff et al. (2001) de que estes retroelementos são encontrados em vários grupos de peixes, mesmo em linhagens extremamente diversas.

A presença dos retroelementos da família *Rex*, especialmente *Rex1* e *Rex3*, em espécies de peixes de famílias e ordens diversas, pertencentes aos grupos Teleostei e também Chondrostei (ordem Polypteriformes), sugere que o ancestral comum de cada um destes retroelementos estava presente antes da divergência das superordens inseridas na subclasse Actinopterygii. Entretanto, apesar da ampla distribuição entre os peixes, tais elementos retrotransponíveis parecem estar ausentes em algumas espécies. Embora *Rex1* tenha sido identificado em todos Acanthopterygii analisados e em Anguiliformes (*Anguilla anguilla* e *A. japonica*), grupo que sofreu divergência desta linhagem dos teleósteos há 180 m.a., este não foi encontrado em *Esox lucius* (Esociformes), *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* (Cypriniformes) e *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes), que sofreram divergência há cerca de 100-120 m.a. (Volff et al., 2000; Ferreira et al., 2011). Da mesma forma, embora *Rex3* provavelmente apresente uma distribuição mais ampla entre os peixes, tendo sido já descrito em diversos grupos como Cyprinodontiformes, Cypriniformes, Esociformes, Anguilliformes (Volff et al., 2001), Perciformes (Volff et al., 2001; Ozouf-Costaz et al., 2004; Teixeira et al., 2009; Mazzuchelli e Martins, 2009; Valente et al., 2010), Tetraodontiformes (Silva et al., 2002), Siluriformes (Ferreira et al., 2010) e Characiformes (Cioffi et al., 2010; presente trabalho), a presença de *Rex3* não foi observada em *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo salar*, pertencentes à ordem Salmoniformes (Volff et al., 2001). Embora seja o elemento da família *Rex* menos estudado até o momento, *Rex6* também parece estar ausente em diversas espécies de peixes. Mesmo em condições de baixa stringência, análises de *slot blotting* não levaram à identificação de *Rex6* em *Oncorhynchus mykiss*, *Esox lucius*, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Anguilla Anguilla* (Teleostei) e *Acipenser sturio* (Chondrostei) (Volff et al., 2001). A utilização de quatro diferentes conjuntos de *primers* em PCR também não permitiu a amplificação de segmentos de DNA associados a *Rex6* em 13 espécies pertencentes a cinco famílias de Notothenioidei (Ozouf-Costaz et al., 2004).

Segundo Volff et al. (2000, 2001), a ausência destes retrotransposons em alguns grupos de peixes pode ser resultado de uma rápida divergência, o que levaria à não identificação destes

devido a mudanças substanciais em suas sequências nucleotídicas, ou resultado de uma perda frequente deste elemento. Entretanto, verifica-se tanto a presença como a ausência de elementos *Rex* entre espécies de um mesmo táxon. Assim, outra hipótese que explicaria a presença/ausência de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em determinados grupos de peixes está relacionada à possibilidade de transferência horizontal de transposons. A transferência horizontal refere-se ao movimento de material entre genomas de espécies reprodutivamente isoladas e, muitas vezes, envolve espécies que apresentam grandes distâncias genéticas (Brown, 2003). Exemplos clássicos de transferência horizontal estão associados à distribuição da família de transposons RTE (*Retrotransposable Element*) em diferentes linhagens de vertebrados (Zupunski et al., 2001; Gentles et al., 2007), de transferência do elemento *mariner* entre Diptera e Neuroptera (Maruyama e Hartl, 1991; Robertson e Lampe, 1995) e do elemento *P* entre espécies de *Drosophila* (Daniels et al., 1990; Loreto et al., 2001). Recentemente, foi demonstrado que o transposon *Helitron*, presente em mais de 100.000 cópias no genoma do morcego *Myotis lucifugus* e ausente na maioria dos mamíferos (Pritham e Feschotte, 2007), tem sua distribuição associada à transferência horizontal (Thomas et al., 2011).

Embora o processo de transferência horizontal pareça ser predominante em famílias de elementos em que a inserção no genoma é controlada por mecanismos próprios (elementos de classe II) e, portanto, retrotransposons tenderiam a ser governados por transmissão vertical (Malik et al., 1999), diversos outros exemplos têm demonstrado a possibilidade de transferência horizontal em retroelementos não-LTR. Estes incluem os elementos *SmaI*-cor de *whitefish* da subfamília Coregoninae (Hamada et al., 1997) e os elementos *Bov-B* encontrados em ruminantes e alguns Squamata (Zupunski et al., 2001).

Os dados do presente trabalho indicam uma maior similaridade tanto de *Rex1* como de *Rex3* de *B. amazonicus*, pertencente à Characidae, com espécies da família Loricariidae (75,6-83,9% e 84,9%, respectivamente), o que poderia ser reflexo do maior grau de relação entre estas duas famílias, ambas incluídas em Ostariophysi. Por outro lado, *Rex1* e *Rex3* de *B. orbignyana* mostraram maior identidade a sequências destes retroelementos descritos para peixes ciclídeos (Acanthopterygii) (86,9-98,7% e 89,6-99,0%, respectivamente) (Tabelas 1 e 2). As análises comparativas realizadas também indicaram um baixo nível de identidade de *Rex3* entre espécies de Characiformes - *Erythrinus erythrinus*, *B. amazonicus* e *B. orbignyana* (valores de 73,9% e 70,3%) (Tabela 2). Além disso, *Rex1* e *Rex3* de *B. amazonicus* e *B. orbignyana* apresentaram uma identidade de somente 75,6% e 84,08%, respectivamente, ou seja, valores inferiores aos observados em comparação com outras espécies de peixes de outros gêneros. Portanto, existe

uma clara divergência de dados entre similaridade nucleotídica de elementos *Rex* e relações filogenéticas entre as espécies.

Da mesma forma, embora existam poucos dados sobre elementos *Rex6* no NCBI, os índices de similaridade observados em comparações entre sequências nucleotídicas deste elemento de diferentes espécies de peixes indicam maiores identidades entre espécies de Acantopterygii de grupos diversos (especialmente Cyprinodontiformes, Perciformes e Beloniformes). Adicionalmente, embora de forma extremamente truncada em sua extremidade 5', o retroelemento *Rex6* encontra-se presente no genoma de espécies de répteis, como *Anolis carolinensis* (Iguanidae) (Kawamura e Yokoyama, 1996), *Trimeresurus flavoviridis* (Crotalinae) (Nobuhisa et al., 1997) e *Geochelone pardalis* (Testudinidae) (Parham et al., 2006).

Casos em que ocorre divergência entre dados filogenéticos clássicos e baseados em similaridade nucleotídica, como observado para os elementos *Rex* em peixes, levam a inferir a ocorrência de transferência horizontal destes elementos transponíveis, como já proposto por Volff et al. (2000, 2001). Além disso, a distribuição descontínua destes elementos, ou seja, a presença destes em algumas espécies e ausência em outras espécies, pertencentes ao mesmo táxon, também pode estar associada à ocorrência de transferência horizontal. Exemplos em que elementos transponíveis são transmitidos de forma vertical tendem a suportar o histórico filogenético de determinado grupo, como evidenciado para os elementos não-LTR *R1* e *R2* encontrados em subgrupos de *Drosophila melanogaster* (Eickbush e Eickbush, 1995).

Outro fator que pode fornecer evidências consistentes de transferência horizontal refere-se ao alto grau de similaridade na sequência nucleotídica de elementos transponíveis em táxons divergentes (Silva et al., 2004). Além de estar presentes em peixes de grupos bastante diversos, grande parte das sequências nucleotídicas dos retroelementos da família *Rex* mostra-se conservada entre diferentes espécies. Variações associadas a pequenas deleções, duplicações, inversões e translocações, como observado para *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, são comuns e podem estar correlacionadas ao próprio processo de transposição de retrotransposons no genoma (Pace e Feschotte, 2007; Cordaux e Batzer, 2009).

Análises prévias realizadas por Volff et al. (1999, 2000) haviam apontado para um significativo grau de conservação do retroelemento *Rex3* entre os teleósteos. Da mesma forma como o observado para o fragmento analisado de *Rex3*, correspondente aos domínios codificantes 1, 2, 2A, A e B do gene da transcriptase reversa (RT) (Volff et al., 2000), a região analisada de *Rex1*, correspondente aos domínios codificantes 3-7 (Volff et al., 2000), também mostra-se relativamente conservada neste retroelemento. Similarmente, embora ainda existam dados escassos associados às sequências nucleotídicas do retrotransposon *Rex6*, a região

analisada, que codifica a porção C-terminal de uma endonuclease (Volff et al., 2001), também parece ser conservada entre diferentes espécies de peixes.

Especificamente em relação a *Rex1*, Volff et al. (2000) propuseram agrupar diferentes espécies com base nas similaridades das sequências nucleotídicas deste retroelemento, tendo como proposição que este estaria associado a múltiplas linhagens ancestrais, sofrendo explosão de retrotransposição independente. Desta forma, este retroelemento teria sido inserido no genoma de diferentes peixes, gerando maiores similaridades nas sequências nucleotídicas de espécies associadas às diferentes linhagens. Quatro principais linhagens já foram descritas - linhagem 1: associada às espécies *Poecilia gracilis* (Poecillidae, Cyprinodontiformes) e *Fugu rubripes* variante C (Tetraodontidae, Tetraodontiformes); linhagem 2: associada a *Xiphophorus maculatus*, *X. helleri*, *Gambusia affinis*, *Phallichthys amates* e *Poecilia mexicana* (Poecillidae, Cyprinodontiformes); linhagem 3: associada a *Fugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes); e linhagem 4: associada a *Oreochromis latipes*, *O. niloticus*, *Cichlasoma labridens*, *Hemichromis bimaculatus* (Cichlidae, Perciformes), *Fundulus fundulus* (Fundulidae, Cyprinodontiformes), *Anguilla anguilla*, *A. japonica* (Anguillidae, Anguilliformes) e *Batrachocottus baikalensis* (Cootocomephoridae, Scorpaeniformis). Dado que *Rex1* de *Brycon amazonicus* apresentou maior identidade em suas sequências nucleotídicas com este retroelemento descrito para espécies de Loricariidae, Cichlidae e Anguillidae e que *Rex1* de *B. orbignyanus* demonstrou maior similaridade em relação a espécies de Cichlidae, Anguillidae e Fundulidae (Tabela 1), as espécies aqui analisadas poderiam ser incluídas junto à linhagem 4.

Da mesma forma como observado para as sequências nucleotídicas dos elementos *Rex*, algumas espécies apresentam maior similaridade em relação ao padrão de localização/distribuição destes elementos nos cromossomos. Até o presente trabalho, retrotransposons da família *Rex* haviam sido fisicamente mapeados em 35 espécies de peixes (Tabela 4), demonstrando que, enquanto algumas espécies exibem um padrão de distribuição disperso ao longo de diversos cromossomos, como observado em vários Gymnotiformes, Perciformes e Siluriformes (Ozouf-Costaz et al., 2004; Teixeira et al., 2009; Valente et al., 2011; Ferreira et al., 2011; Sene, 2011), outras espécies, como *Eigenmania* sp., *Astronotus ocellatus*, *Chaetobranchius flavescens*, *Cichla kelberi*, *Astatotilapia latifasciata*, *Oreochromis niloticus*, *Satanoperca jurupari* e *Notothenia coriiceps*, além de mostrarem a presença de cópias destes retroelementos dispersas ao longo dos cromossomos, também mostraram sítios mais evidentes em alguns cromossomos específicos, associados a regiões heterocromáticas (Silva et al., 2002; Bouneau et al., 2003; Ozouf-Costaz et al., 2004; Teixeira et al., 2009; Gross et al., 2009;

Mazuchelli e Martins. 2009; Cioffi et al., 2010; Valente et al., 2011; Matoso et al., 2011; Ferreira et al., 2011; Sene, 2011; Fantinatti et al., 2012).

No presente trabalho, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada na tentativa de localizar sítios de repetições *Rex* nos cromossomos de *Brycon amazonicus* e *B. orbignyanus*, já que os protocolos de FISH utilizados em cromossomos metafásicos permitem a visualização de segmentos de DNA de pelo menos 10Kb (Jiang et al., 1995) o que, no caso de elementos repetitivos como *Rex*, levaria à sua detecção somente quando estes estivessem presentes em grande quantidade no genoma e agrupados próximos uns aos outros (*clusters*). Embora alguns peixes apresentem grande quantidade de cópias de elementos *Rex*, como demonstrado por meio de *slot blotting* quantitativo em *Xiphophorus* (cerca de 1.000 cópias), um número reduzido de cópias de *Rex3* foi identificado em *Danio rerio* (500 cópias) e *Cyprinus carpio* (50 cópias) (Volf et al., 1999). Espécies de Anguilliformes possuem somente cerca de 5 cópias do retroelemento *Rex1* em seu genoma (Volf et al., 2000).

Sítios de *Rex6* não puderam ser visualizados nos cromossomos de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* provavelmente devido ao reduzido número de cópias deste retroelemento no genoma destas espécies. Alternativamente, como já sugerido por Ozouf-Costaz et al. (2004) para espécies de peixes da subordem Notothenioidei, a ausência de sinais fluorescentes nos cromossomos também pode estar associada a um padrão de distribuição extremamente disperso deste retroelemento.

Em relação a *Rex1* e *Rex3* de *B. amazonicus* e *B. orbignyanus*, embora a técnica de FISH não tenha evidenciado sinais fluorescentes de grande intensidade, estes puderam ser observados ao longo de distintos cromossomos destas espécies. Marcações mais evidentes, associadas a *Rex1*, em regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns pares cromossômicos também foram observadas para ambas espécies, o que provavelmente está associado a um maior número de cópias destes elementos repetitivos agrupadas próximas umas às outras. Adicionalmente, sinais fluorescentes dispersos de *Rex1* e *Rex3* puderam ser identificados em núcleos interfásicos. Os resultados indicam que *B. amazonicus* e *B. orbignyanus* apresentam um padrão geral de distribuição dispersa dos retroelementos *Rex1* e *Rex3*, além de um padrão mais compartimentalizado de *Rex1* em regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos, possivelmente associadas a blocos de heterocromatina constitutiva, já que estas espécies apresentam bandas C bastante evidentes nestas regiões da maioria de seus cromossomos (Margarido e Galetti, 1996; Almeida-Toledo et al., 1996; Margarido e Galetti, 1999).

O acúmulo preferencial de elementos transponíveis em regiões heterocromáticas ou intergênicas é uma característica comum em organismos eucariotos multicelulares (Mroczek e

Dawe, 2003; Hua-Van et al., 2005) e sugere que estes façam parte da estrutura e da organização destas regiões ou que estejam inseridos em regiões pobres em genes e que, portanto, não sofrem grande pressão de seleção (Dimitri e Junakovic, 1999; Dawe, 2003). Elementos transponíveis associados à heterocromatina vêm sendo descritos em animais, como em *Drosophila melanogaster* em que estes formam *clusters* proeminentes nestas regiões (Bartolome et al., 2002). Em peixes, o retrotransposon *Zebulon*, isolado do genoma de *Tetraodon nigroviridis*, também se encontra associado a regiões heterocromáticas (Bouneau et al., 2003).

Da mesma forma como observado para *B. amazonicus* e *B. orbignyanus*, uma distribuição dispersa de *Rex3* nos cromossomos e alguns *clusters* associados a regiões heterocromáticas centroméricas e pericentroméricas também foram encontrados para *Erythrinus erythrinus* (Cioffi et al., 2010), evidenciando assim um padrão similar de localização de retroelementos *Rex* em espécies do grupo Characiformes. Da mesma forma, espécies de um mesmo gênero ou família apresentam um padrão extremamente similar de distribuição/localização de repetições *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em seus cromossomos (Tabela 4). Em Sternopygidae, embora uma espécie de *Eigenmania* possua *clusters* de *Rex 1* e *Rex3* em algumas regiões heterocromáticas específicas, todas as demais espécies analisadas apresentam cópias destes elementos dispersas em diversos cromossomos (Sene, 2011). Espécies de Loricariidae mostram sítios de *Rex1* e *Rex3* também dispersos (Ferreira et al., 2011). Em Perciformes, ordem para a qual existe um maior número de dados acerca da localização cromossômica de elementos da família *Rex*, existem grupos que apresentam um padrão disperso de localização destes retrotransposons, como Nototheniidae, Artedidraconidae, Bathydraconidae, Bovichtidae e Channichthyidae (Ozouf-Costaz et al., 2004), e um outro grupo, composto por espécies da família Cichlidae, que apresenta, além de pequenos sítios dispersos, repetições *Rex* associadas a regiões heterocromáticas específicas (Mazuchelli e Martins, 2009; Teixeira et al., 2009; Gross et al., 2009; Valente et al., 2011; Fantinatti et al., 2012). A exceção a este padrão refere-se à presença de *clusters* de *Rex* em regiões eucromáticas de cromossomos de *Cichla kelberi*, característica que pode ser associada ao fato de que esta espécie apresenta um cariótipo mais similar ao provável cariótipo ancestral dos ciclídeos (Teixeira et al., 2009), ou seja, com menores alterações e diferente das demais espécies do grupo (Valente et al., 2011). Adicionalmente, no grupo Cichlidae, duas espécies - *Oreochromis niloticus* e *Astatotilapia latifasciata* - possuem também sítios conspícuos de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* ao longo dos cromossomos do par número 1 (Valente et al., 2011; Fantinatti et al., 2012), característica que, no caso de *O. niloticus*, provavelmente está associada ao processo de fusão e diferenciação molecular de cromossomos sexuais (Valente et al., 2011).

Os dados comparativos acerca dos padrões de distribuição de cópias de elementos *Rex* nos cromossomos de diversas espécies de peixes indicam estes tendem a se acumular de forma semelhante nos cromossomos de um mesmo grupo de peixes. Recentes estudos têm evidenciado que vários elementos móveis direcionam sua integração no genoma a sítios específicos nos cromossomos, sugerindo a ocorrência de alguma forma de interação entre cada transposon e o genoma hospedeiro (e.g. Kidwell e Lisch, 2000; Bushman, 2003; Gao et al., 2008). Cromodomínios, que comumente representam domínios específicos em proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina e regulação gênica em eucariotos (Brehm et al., 2004), foram também identificados na região C-terminal (*Carboxil terminus*) da enzima integrase de alguns transposons, o que sugere que estes possuem uma função de controle da integração de elementos transponíveis no genoma (Gao et al., 2008; Novikova, 2009). Portanto, a despeito do modo de aquisição dos elementos repetitivos *Rex* em peixes, que pode estar associado à transferência horizontal, após sua introdução estes provavelmente passaram a evoluir em conjunto ou por meio de um mesmo mecanismo em espécies mais relacionadas filogeneticamente, já que os locais em que estes elementos repetitivos se integraram podem ter características únicas para diferentes grupos de peixes. Como resultado, grupos divergentes apresentariam assim padrões distintos de distribuição não randômica destes retrotransposons.

Embora já existam dados acerca de diferentes transposons em peixes, estes ainda são extremamente escassos, especialmente frente à grande diversidade de espécies deste grupo. A obtenção de um maior número de dados, incluindo informações sobre as sequências nucleotídicas completas, densidade gênica, conteúdo GC, taxas de recombinação, epigenética e localização física destes elementos fornecerá maior embasamento a proposições acerca de sua origem, evolução, organização e função no genoma.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados apresentados no presente trabalho, pôde-se concluir que:

1. Retrotransposons não-LRT da família *Rex* estão presentes no genoma de espécies da família Characidae e, em *Brycon amazonicus* e *B. orbignyanus*, encontram-se organizados em diversos *clusters* em diferentes cromossomos, tendo preferencialmente um padrão de distribuição dispersa.
2. A aquisição de elementos repetitivos da família *Rex* em peixes provavelmente está associada à transferência horizontal e sua distribuição nos cromossomos segue um padrão similar entre espécies de grupos mais correlacionados filogeneticamente, o que sugere um mecanismo não aleatório de integração, manutenção e evolução destes elementos no genoma dos peixes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K.T. (2011). Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- Almeida-Toledo, L.F., Bigoni, A.P., Bernardino, G., Foresti, F., Toledo-Filho, S.A. (1996). Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia* 49: 35-43.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Antunes, R.S.P., Gomes, V.N., Prioli, S.M.P., Prioli, R.A., Júlio, H.F., Prioli, L.M., Agostinho, C.S., Prioli, A.J. (2010). Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 19: 674-684.
- Aparício, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297: 1301-1310.
- Arbeláez-Rojas, G.A., Moraes, G. (2010). Optimization of sustaining swimming speed of matrinxã *Brycon amazonicus*: performance and adaptive aspects. *Scientia Agricola* 67: 253-258.
- Banack, S.A., Horn, M.H., Gawlicka, A. (2002). Disperser- vs. establishment-limited distribution of a riparian fig tree (*Ficus insipida*) in a Costa Rica tropical rain forest. *Biotropica* 34: 232-243.
- Barrero, N.M.L., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N. (2006). Genetic diversity in piracanjuba populations of *Brycon orbignyanus* with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Animal Science* 84: 170-170.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M. (2003). Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes* 3: 297-298.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* 247: 51-65.
- Bartolome, C., Maside, X., Charlesworth, B. (2002). On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 19: 926-937.
- Batista, V.S., Petrere, M. (2003). Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. *Acta Amazônica* 33: 53-66.

- Batista, V.S., Ribeiro, M.O.A., Fabr , N.N. (2007). O conhecimento tradicional e a abordagem ecossist mica no manejo da várzea na Amazônia. In: Moura, F.B.P. (ed.). Conhecimento tradicional e estratégias de sobrevivência de popula es brasileiras. v.1. 1  edic o. EDUFAL, Maceió, Brasil.
- Belmont, R.A.F. (1994). Considera es sobre a propaga o artificial da piracanjuba, *Brycon orbignyianus* - CESP. I Seminário sobre Cria o de Espécies do Gênero *Brycon* 1: 17-18.
- Berra, T. (2001). Freshwater fish distribution. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Bi mont, C., Vieira, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521-524.
- Biet, E., Sun, J., Dutreix, M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*. 27: 596-600.
- B hne, A., Brunet, F., Galiana-Arnoux, D., Schultheis, C., Volff, J.N. (2008). Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research* 16: 203-215.
- Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E. (2003). Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Resources* 16: 362-369.
- Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E. (2006). Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyianus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture and Nutrition* 12: 183-191.
- Borges, G.A. (1986). Ecologia de tr s espécies do gênero *Brycon* (M ller-Troschel, 1844) (Pisces-Characidae) no rio Negro, Amazonas, com ênfase na caracteriza o taxonômica e alimenta o. Disserta o de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.
- Borghetti, J.R., Canzi, C., Nogueira, S.V.G. (1991). A influência da proteína no crescimento do matrinxã (*Brycon orbignyianus*) em tanques-rede. *Revista Brasileira de Biologia* 51: 695-699.
- Bouneau, L., Fisher, C., Ozouf-Costaz, C., Froschauer, A., Jaillon, O., Coutanceau, J.P., Korting, C., Weissenbach, J., Bernot, A., Volff, J.N. (2003). An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research* 13: 1686-1695.
- Bourque, G. (2009). Transposable elements in gene regulation and in the evolution of vertebrates genome. *Current Opinions in Genetics and Development*. 19: 607-612.
- Braga, R.A. (1982). Deple o aparente do matrinxã, *Brycon hilarii*, em pesqueiros do Rio São Francisco. *Boletim Técnico DNOCS* 40: 175-180.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., Araújo, L.D., Silva, A.L.F. (2005). Densidade de estocagem de matrinxã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 299-303.

- Brehm, A., Tufteland, K.R., Aasland, R., Becker, P.B. (2004). The many colours of chromodomains. *Bioessays* 26: 133-140.
- Briggs, J.C. (2005). The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *Journal of Biogeography* 32: 287-294.
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do estado de São Paulo. Sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca, São Paulo, Brasil.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. 3a. edição. Ministério da Irrigação, CODEVASF, Minas Gerais, Brasil.
- Britski, H.A., Silimon, K.Z. Lopes, B.S. (1999). Peixes do Pantanal: manual de identificação. Embrapa-SPI, Corumbá, Embrapa-CPAP, Brasília, Brasil.
- Britten, R.J., Kohne, D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- Brown, J.R. (2003). Ancient horizontal gene transfer. *Nature* 4: 121-132.
- Buckup, P.A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Burke, W.D., Müller, F., Eickbush, T.H. (1995). R4, a non-LTR retrotransposon specific to the large subunit rRNA genes of nematodes. *Nucleic Acids Research* 23: 4628-4634.
- Bushman, F.D. (2003). Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* 115: 135-138.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 135-153.
- Camargo, A.C.S., Zaiden, S.F., Urbinati, E.C. (2008). Desenvolvimento gonadal de fêmeas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, submetidas a restrição alimentar. *Ciência Rural* 38: 1105-1110.
- Capriglione, T., Odierna, G., Caputo, V., Canapa, A., Olmo, E. (2002). Characterization of Tc1-like transposon in Antarctic ice-fish *Chionodraco hamatus*. *Gene* 295: 193-198.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P., Vieira, F. Oliveira, C. (2004). A phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). *Copeia* 2004: 496-506.
- Cecarelli, O.S, Senhorini, J.A (1996). *Brycon*: viabilização da produção de alevinos. *Panorama da Aqüicultura* 35: 10-11.
- Cestari, A.N. (1973). Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. In: *Exercícios Práticos de Genética*. Companhia Editora Nacional, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Chao, L.N, Petry, P., Prang, G., Sonneschien, L., Tlusty, M. (2001). Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil. Editora da Universidade do Amazonas, Manaus, Brazil.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Cioffi M.B., Martins C., Vicari, M.R., Rebordinos, L., Bertollo, L.A.C. (2010). Differentiation of the XY sex chromosomes in *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sexual Development* 4: 176-185.
- COPAM (1996). Conselho Estadual de Política Ambiental. Deliberação n. 041/95. COPAM 104: 1-4.
- Cordaux, R., Batzer, M.A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews Genetics* 10: 691-703.
- Cruz, C.P.E., Pardo, C.S.C., Arias, C.J.A., Lombo, C.P.E., Lombo, R.D.A. (2004). Cryopreservation of yamu *Brycon siebenthalae*. *Journal of World Aquaculture Society* 35: 529-535.
- Daniels, S.B., Peterson, K.R., Strausbaugh, L.D. (1995). Evidence for horizontal transmission of the P-transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339-355.
- Dawe, R.S. (2003), Ultraviolet A1 phototherapy. *British Journal of Dermatology*, 148: 626–637.
- Dimitri, P, Junakovic, N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis - new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends in Genetics* 15: 123-124.
- Dombroski, B.A., Feng, Q., Mathias, S.L. (1994). An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology* 14: 4485-4492.
- Drew, A.C., Brindley, P.J. (1997). A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates. *Molecular Biology Evolution* 14: 602-610.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A. (2010). Geneious v. 5.1, Available from [www.geneious.com](http://www.geneious.com).
- Eckmann, R. (1984). Induced reproduction in *Brycon cf. erythropterus*. *Aquaculture* 38: 379-82.
- Egozcue, Y. (1971). *Técnicas em citogenética*. Editora Espaxs, Barcelona, Spain. 144p.
- Eickbush, D.G.J., Eickbush, T.H. (1995). Vertical transmission of the retrotransposable elements R1 and R2 during the evolution of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Genetics* 139(2): 671-684.

- Eickbush, T.H., Malik, H.S. (2002). Origin and evolution of retrotransposons. In: Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M. (eds.). *Mobile DNA II*. American Society for Microbiology Press, Washington, USA.
- Eschmeyer, W.N., Fong, J.D. (2010). Species of fishes by family/subfamily. On-line version: <http://research.calacademt.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>. Assessed on February, 2011.
- Fantinatti, B.E.A., Mazzuchelli, J., Valente, G.T., Cabral-de-Melo, D.C., Martins, C. (2012). Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica* 139: 1273-1282.
- Faria, C.A. (1994). Propagação artificial de piabanha (*Brycon insignis*) na seção de hidrobiologia e aquicultura de Paraibuna-CESP. I Seminário Sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon. 1: 09-15.
- Feiden, A., Hayashi, C. (1999). Desenvolvimento de alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849), em tanques experimentais com diferentes adubações orgânicas. Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. UFRGS. Porto Alegre, Brasil: 26-29.
- Ferreira, D.C., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F. (2011). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements* 1: 112-117.
- Ferreira, E.J.G., Zuanon, J.A.S., Santos, G.M. (1998). Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará. Edições IBAMA, Brasília, Brasil.
- Ferreira, I.A., Poletto, A., Kocher, T.D., Mota-Velasco, J.C., Penman, D., Martins, C., (2010). Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. *Cytogenetics and Genome Research* 129: 314-322.
- Feschotte, C. (2004). Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. *Molecular Biology and Evolution* 21:1769-1780.
- Feschotte, C., Pritham, E.J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review on Genetics* 41: 331-368.
- Fischer, C., Bouneau, L., Coutanceau, J.P., Weissenbach, J., Volff, J.N., Ozouf-Costaz, C. (2004). Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336: 175-184.
- Fontana, C.S., Bencke, G.A., Reis, R.E. (2002). Projeto livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT-PUCRS) e Edipocrs, Porto Alegre, Brasil.
- Foresti, F., Oliveira, C., Galetti, P.M., Almeida-Toledo, L.F. (1993). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*. 36: 1124-1128.

- Frasca-Scorvo, C.M., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B. (2007). Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon amazonicus* em tanques de cultivo. *Acta Amazonica* 37: 621-628.
- Galhardo, E., Toledo-Filho, S.A. (1987). Estudo genético-bioquímico de pirapitinga do sul, *Brycon* sp., da Estação de Paraibuna, CESP. *Ciência e Cultura* 39: 722.
- Ganeco, L., Nakaghi, L., Urbinati, E., Dumont-Neto, R., Vasques, L.H. (2001). Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante o ciclo reprodutivo. *Boletim do Instituto de Pesca* 27: 131-138.
- Gao, X., Hou, Y., Ebina, H., Levin, H.L., Vaytas, D.F. (2008). Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Research* 18: 359-369.
- Gentles, A.J., Wakefield, M.J., Kohany, O., Gu, W., Batzer, M.A., Pollock, D.D. Jurka, J. (2007). Evolutionary dynamics of transposable elements in the short-tailed opossum *Monodelphis domestica*. *Genome Research* 17: 992-1004.
- Géry, J. (1977). Characoids of the world. T.F.H. Publications, Neptune City, USA.
- Géry, J e Mahnert, V. (1992). Notes sur quelques *Brycon* dès bassins de l'Amazone Du Parana-Paraguay ET Du Sud-Est brésilien. (Pisces, Characiformes, Characidae). *Revue Suisse Du Zoology* 99: 793-819.
- Godoy, M.P. (1975). Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da Bacia do Rio Mogi Guassú. Editora Franciscana, Piracicaba, Brasil.
- Gomes, L.C., Baldisserotto, B., Senhorini, J.A. (2000). Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. *Aquaculture* 183: 73-81.
- Gomiero, L.M., Villares, G.A., Naous, F., (2009). Reproduction of *Cichla kelberi*. *Brazilian Journal of Biology* 69: 175-183.
- Goulding, M. (1980). The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history. University of California Press, Berkeley, USA.
- Graef, E.W., Resende, E.K., Petry, P. (1986). Crescimento do matrinxã (*Brycon cephalus*) e jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) em pequenas represas. IV Simpósio Brasileiro de Aqüicultura: 26.
- Graef, E.W., Resende, E.K., Petry, P., Storti Filho, A. (1987). Policultivo de matrinxã (*Brycon* sp.) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp.) em pequenas represas. *Acta Amazônica*. 17: 33-42.
- Gross, M.C., Schneider, C.H., Valente, G.T., Porto, J.I.R., Martins, C., Feldberg, E. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetics and Genome Research* 127: 43-53.
- Hamada, M., Kido, Y., Himberg, M. (1997) A newly isolated family of short interspersed repetitive elements (SINES) in coregonid fishes (whitefish) with sequences that are almost

- identical to those of the *SmaI* family of repeats: possible evidence for the horizontal transfer of SINEs. *Genetics* 146: 355-367.
- Han, K., Konkel, M.K., Xing, J., Wang, H., Lee, J., Meyer, T.J., Huang, C.T., Sandifer, E., Hebert, K., Barnes, E.W., Hublet, R., Miller, W., Arian, F.A., Ullmer, S.B., Batzer, M.A. (2007). Mobil DNA in old world monkeys. A glimpse through the *Rhesus* macaque genome. *Science* 316: 238-240.
- Hilsdorf, A.W.S., Azeredo-Espin, A.M.L., Krieger, M.H., Krieger, J.E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*. 214: 81-91.
- Hilsdorf, A.W.S., Oliveira, C., Lima, F.C.T., Matsumoto, C.K. (2008). A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes: Characidae: Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. *Genetics and Molecular Biology* 31: 366-371.
- Horn, M.H. (1997). Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rican tropical rain forest. *Oecologia* 109: 259-264.
- Howes, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 43: 1-47.
- Hua-Van, A., Le Rouzic, A., Maisonhaute, C., Capy, P. (2005). Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenetics and Genome Research* 110: 436-440.
- Hurtado-Alarcon, J.C., Mancera-Rodrigues, N.J., Saldamando-Benjumea, C.I. (2011). Genetic variability of *Brycon henna* (Characiformes: Characidae) in the middle basin of Nare and Guatape rivers, Magdalena River system, Colombia. *Revista de Biología Tropical* 59: 269-282.
- IBAMA. (2004). Estatística da pesca 2003. IBAMA. Brasília, Brasil.
- IUCN. (2012). Red List of Threatened Species.
- Izel, A.C.U., Pereira-Filho, M., Melo, L.A.S., Macedo, J.L.V. (2004). Evaluation of dietary protein contents for juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amazonica* 34: 179-184.
- Jaillon, O., Aury, J-M., Brunet, F., Petit, J-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D. Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C. Segurens, B., Silva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubein, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biéumont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J-P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K.J., McEwan, P., Bosak, S. Kellis, M., Volff, J-N., Guigó, R., Zody, M.C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nsbaum, C., Kahn, D., Robison-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quétier, F., Saurin, W. Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E.S., Weissenbach, J., Crollius, H.R.

- (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946-957.
- Jiang, J.M., Gill, B.S., Wang, G.L., Ronald, P.C., Ward, D.C. (1995). Metaphase and interphase fluorescence in-situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4487-4491.
- Jurka, J. (2000). Repbase update: a database and electronic journal of repetitive elements. *Trends in Genetics* 16: 418-420.
- Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetics and Genome Research*. 110: 462-467.
- Kajikawa, M, Ohshima, K., Okada, N. (1997). Determination of the entire sequence of turtle CR1 elements encodes a protein with a novel zinc finger motif. *Molecular Biology Evolution* 14: 1206-1217.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S. Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K, Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A. Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, Shin-ishi, Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., Kohara, Y. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447: 7145:7149.
- Kawamura, S., Yokoyama, S. (1996). Phylogenetic relationships among short wavelength-sensitive opsins of American chameleon (*Anolis carolinensis*) and other vertebrates. *Vision Research* 36: 2797-2804.
- Kazazian, H.H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632.
- Keith, R.S., Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genomes. *Nature Reviews Genetics* 8: 272-285.
- Kidwell, M.G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- Kidwell, M.G., Lisch, D.R. (2000). Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 95-99.
- Kim, T.M., Hong, S.J., Rhyu, M.G. (2004). Periodic explosive expansion of human retroelements associated with the evolution of the hominoid primate. *Journal of Korean Medical Science* 19: 177-185.
- Lankenau, D-H., Volff, J.N. (2009). Transposons and the dynamic genome. Springer. Heidelberg.

- Lathe, W.C., Burke, W.D., Eickbush, D.G., Eickbush, T.H. (1995). Evolutionary stability of the R1 retrotransposable element in the genus *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 12: 1094-1105.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. Pearson Education. Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Li, W., Zhang, P., Fellers, J.P., Friebe, B., Gill, B.S. (2004). Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *Plant Journal* 40: 500-511.
- Li, Y.C., Kord, A.B., Fahima, T., Berles A., Nero E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Lima, F.C.T. (2001). Revisão taxonômica do gênero *Brycon* Müller e Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cis-andina (Pisces: Ostariophysii: Characiformes: Characidae). Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Lima, F.C.T. (2003). Subfamily Bryconinae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. (eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Lima, F.C.T., Castro, R.M.C. (2000). *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysii: Characiformes). *Ichthyological Exploration of Freshwater* 11: 55-62.
- Lins, L.V., Machado, A.B.M., Costa, C.M.R., Herrmann, G. (1997). Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil.
- Liu, Z., Li, P., Kocabas, A., Karsi, A., Ju, Z. (2001). Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 289: 317-324.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Liu, Z.Y., Moores, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Stiles, J.I., Zee, F.T., Peterson, A.H., Ming, R. (2004). A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*. 427: 348-352.
- Lopera-Barrero, N.M. (2007). Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R. Sirol, R. (2008). Genetic characterization of *Brycon orbignyanus* stocks used in restocking programs. *Medicina Veterinária de Córdoba*. 13: 1110-1119.

- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Povh, J.A., Gomes, P.C., Vargas, L., Streit, D.P. (2006). Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal of Animal Science* 84: 170-170.
- Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Sirol, R.N. (2010) Genetic characterization of *Brycon orbignyanus* using the semi-natural system. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62: 184-191.
- Lopez, D.D., Palacio, G.V., Cortes, T.R. (2008). Cytogenetic characterization of the neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Biologia Topical* 56: 1619-1628.
- Loreto, E.L.D., Valente, V.L.D., Zaha, A. (2001) *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. *Journal of Heredity* 92: 375-381.
- Lundberg, J.G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with paradigm. In: Goldblatt, P. (ed.). *Biological Relationships between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven, USA.
- Lyon, M.F. (2000). LINE-1 elements and X chromosome inactivation: a function for B junk DNA? *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* 97: 6248-6249.
- Machado, A.B.M., Drummond, B.M. and Paglia, A.P. (2008). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil.
- Malik, H.S., Eickbush, T.H. (1999). The RTE class of non-LTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINEs. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1123-1134.
- Margarido, V.P., Galetti, P.M. (1996). Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228.
- Margarido, V.P., Galetti, P.M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 22: 357-361.
- Mariguela, T.C., Nirchio, M., Ron, E. (2010). Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Comparative Cytogenetics* 4: 185-193.
- Mariyama, K, Hartl, D.L. (1991). Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. *Genetics* 128: 319-329.
- Martinez-Ibarra, J.A., Guillen, Y., Arredondo-Jimenez, J.J., Rodriguez-Lopez, M.H. (2002). Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in Southern México. *BioControl* 47: 481-486.
- Martins, C., Galetti, P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiforme). *Chromosome Research* 7: 363-367.

- Martins, C., Cabral-de-Mello, D.C., Valente, G.T., Mazzuchelli, J., Oliveira, S.G., Pinhal, D. (2011). Animal genomes under the focus of cytogenetics. Nova Science, New York, USA.
- Matoso, D.A., Almeida-Val, V.M.F., Silva, M., Moraes-Neto, A., Almeida, M.C., Vicari, M.R., Moreira-Filho, O., Artoni, R.F. (2011). Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodiade): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Reviews on Fish Biology and Fisheries* 21: 497-508.
- Matsumoto, C., K., Hilsdorf, A.W.S. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner 7: 395-402.
- Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L., Mohun, T. (1983). Expression and organization of histone genes. *Annual Review of Genetics*.17: 239-377.
- Mazzuchelli, J., Martins, C. (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136: 461-469.
- Melo, J.S.C. (1994). Criação de espécies do gênero *Brycon*. In: I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*. CEPTA, Pirassununga, Brasil.
- Melo, K.S.G. (2007). Extração e uso de corantes vegetais da Amazônia no tingimento do couro de matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1819). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas.
- Mendonça, J.O.J. (1994). Criação de espécies do gênero *Brycon*. In: I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*. CEPTA, Pirassununga, Brasil.
- Mendonça, J.O.J., Melo, J.S.C. (1994). Introdução. I Seminário sobre criação de espécies do Gênero *Brycon*. CEPTA, Pirassununga, Brasil.
- Mirande, J.M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8: 385-568.
- Moraes, F.R.; Martins, M.L. (2004). Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (eds). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Editora TechArt, São Paulo, Brasil.
- Moreira, A.B., Visentainer, J., de Souza, J.E., Matsushita, M. (2001). Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition Analysis* 14: 565-574.
- Mroczek R.J., Dawe, R.K. (2003). Distribution of retroelements in centromeres and neocentromeres of maize. *Genetics* 165: 809-819.
- Murgas, L.D.S., Franciscatto, R.T., Santos, A.G.O. (2003). Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanys*, Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira de Zootecnia* 6: 1810-1814.

- Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Franciscatto, R.T., Maria, A.N. (2004). Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33: 1361-1365.
- Narahara, M.Y., Andrade-Talmelli, E.F., Kavamoto, E.T., Godinho, H.M. (2002). Reprodução induzida da pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1070-1075.
- Nei, M., Rooney, A.P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39: 121-152.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the world*. 3<sup>rd</sup>. edition. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. 4<sup>th</sup>. Edition. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Nelson, R. (2009). Ray-Finned Fishes. UntamedScience. <http://www.untamedscience.com/biodiversity/animals/chordates/ray-finned-fishes>. Assessed on February, 2012.
- Nobuhisa, I., Inamasu, S., Nakai, M (1997). Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhabits basic phospholipase A(2) isozymes in the snake's venom. *European Journal of Biochemistry* 249: 838-845.
- Novikova, O. (2009). Chromodomains and LTR retrotransposons in plant. *Communicative and Integrative Biology* 2: 158-162.
- Oliveira, S.R., Souza, R.T.Y.B., Brasil, E.M., Andrade, J.I.A., Nunes, E.S.S., Ono, E.A., Affonso, E.G. (2011). LD<sub>50</sub> of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica* 41: 321-326.
- Ozouf-Costaz, C., Brandt, J., Körting, C., Pisano, E., Bonillo, C. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16: 51-57.
- Pace, J.K., Feschotte, C. (2007). The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome Research* 17: 422-432.
- Panarari-Antunes, R.S., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Galdino, A.S., Julio Jr, H.F. Prioli, L.M. (2011). Genetic variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in cultivated and natural populations of the Upper Paraná River, and implications for the conservation of the species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54: 839-848.
- Parham, J.F., Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Feldman, C.R., Turkozan, O., Polymeni, R., Boore, J. (2006). The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 50-64.

- Parise-Maltempi, P.P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetics and Genome Research* 116: 218-223.
- Peaston, A.E., Evsikov, A.V., Graber, J.H., de Vries, W.N., Holbrook, A.E., Solter, D., Knowles, B.B. (2004). Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Developmental Cell* 7: 597-606.
- Pezzato, L.E. et al. (2009). Valor Nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 43-51.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986). Genetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83: 2934-2938.
- Pizango-Paima, E.G. (1997). Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Characiformes, Characidae) na Amazônia Central. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas.
- Pokorna, M., Kratochvil, L., Kejnovsky, E. (2011). Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: 1471.
- Porto, J.I.R., Feldberg, E., Nakayama, C.M., Falcão, J. (1992). A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Revista de Hydrobiologia Tropical* 25: 287-299.
- Portugal, L.P.S. (1990). Revisão sistemática do gênero *Triportheus* Cope (Teleostei, Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. (2003). A vida dos vertebrados. 3a. edição. Atheneu Editora, São Paulo, Brasil.
- Poulter, R., Butler, M., Ormandy, J. (1999). A LINE element from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes* which shows similarity to the CR1 family of non-LTR retrotransposons. *Gene* 227: 169-179.
- Pritham, E.J., Feschotte, C. (2007). Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104: 1895-1900.
- Priolli, R.H.G., Pinheiro, J.B., Zucchi, M.I., Bajay, M.M., Vello, N.A. (2010). Genetic Diversity among Brazilian soybean cultivars based on SSR loci and pedigree data. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 53: 519-531.
- Raskina, O., Barber, J.C., Nevo, E., Belyayev, A. (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetics and Genome Research* 120: 351-357.

- Ray, D.A., Xing, J., Salem, A.H., Batzer, M.A. (2006). SINEs of a nearly perfect character. *Systematics Biology* 55: 928-935.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Reynalte-Tataje, D.A., Luz, R.K., Meurer, S., Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P.O. (2002). Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientific Animal Science* 24: 439-443.
- Robertson, H.M., Lampe, D.J. (1995). Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Molecular Biology and Evolution* 12: 850-862.
- Rodriguez-Rodriguez, M.D., Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P. (2010). Genetic diversity of piracanjuba used in stock enhancement programs with microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 56-63.
- Romagosa, E., Ayroza, L.M.S., Sanches, E.G. et al. (1994). Informes preliminares sobre a reprodução induzida do matrinchã, *Brycon cephalus*. In: Simpósio Brasileiro De Pesquisas Em Medicina Veterinária, 1. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo: 111.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I., Fenerich-Verani, N. (2001). Seleção e caracterização de fêmeas de matrinchã, *Brycon cephalus*, induzidas à reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca* 27: 139-147.
- Rosa, R.S., Menezes, N.A. (1996). Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 647-667.
- Saint-Paul, U., Werder, U. (1977). Aspectos generales sobre la piscicultura en Amazonas y resultados preliminares de experimentos de alimentacion con raciones paletizadas con diferentes composiciones. Simposio de la Asociacion Latinoamericana de Aquicultura.
- Sallum, W.B. (1988). Cultivo do matrinchã (*Brycon lundii* REINHARDT, 1974) em gaiolas na represa de Três Marias. In: Encontro Anual de Aquicultura, 6: 13.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup>. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanches, A., Galetti, P.M. (2006). Microsatellite loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes* 6: 1045-1046.
- SanMiguel, P., Bennetzen, J.L. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany*. 82: 37-44.

- Santis, H.P., Chacon, L.A, Echavarría, A.E. (2007). Characterization of the genetic diversity of the fish *Brycon henni* (Characiformes:Characidae) in central Colombia with RAPD markers. *Revista de Biología Tropical* 55: 1025-1035.
- Santos, A.F., Feldberg, E., Bertollo, L.A.C. (1985). Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica; *Brycon* sp. (Bryconinae, Characidae). XIII Congresso Brasileiro de Zoologia.
- Santos, G.M., Ferreira, E.J.G., Zuanon, J.A.S. (2006). Peixes comerciais de Manaus. IBAMA-AM/ProVárzea, Manaus, Brasil.
- Santos-Filho, L.C., Batista, V.S. (2009). Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia central. *Zoologia* 26: 195-203.
- Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. (1998). Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science* 3: 195-199.
- Scorvo-Filho, J.D., Martin, N.B., Ayrosa, L.M.S. (1998). Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997. *Informações Econômicas* 28: 41-60.
- Sela, N., Kimm, E., Ast, G. (2010). The role of transposable elements in the evolution on non-mammalian vertebrates and invertebrates. *Genome Biology* 11: 1-13.
- Sene, V.F. (2011) Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.
- Shimoda, N., Chevrette, M., Ekker, M., Kikuchi, Y., Hotta, Y., Okamoto, H. (1996). Mermaid, a family of Short Interspersed Repetitive Elements, is useful for zebrafish genome mapping. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 220: 233-237.
- Silva, C., Hadji, H., Ozouf-Costaz, C., Nicaud, S., Jaillon, O. (2002). Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 99: 13636-13641.
- Silva, J.C., Loreto, E.L., Clark, J.B. (2004). Factors that affect horizontal transfer of transposable elements. *Current Issues on Molecular Biology* 6: 57-72.
- Silveira, A.N. (2000). Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilização do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1860) (Teleostei, Characidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.
- Slotkin, R.K., Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics* 8: 272-285.
- Soares, M.D.C., Urbinati, E.V., Senhorini, J.A. (2003). Periodic variation of plasma triiodotironina (T3) and its effect on the induced reproduction of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Brazilian Journal of Animal Science* 32: 1825-1834.
- Syvanen, M. (1994). Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annual Reviews on Genetics* 28: 237-261.

- Tarlinton, R.E., Meers, J., Young, P.R. (2006). Retroviral invasion of the koala genome. *Nature* 442: 79-81.
- Tavares-Dias, M., Affonso, E.G., Oliveira, S.R., Marcon, J.L., Egami, M.I. (2008). Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazônica* 38: 799-806.
- Teixeira, W.G., Ferreira, I.A., Cabral-de-Mello, D.C., Mazzuchelli, J., Valente, G.T., Martins, C. (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetics Genome Research* 125: 224-234.
- The Genome International Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Thomas, C., T.H. Bonner, and B.G. Whiteside. (2011). Texas freshwater fish: Brazos drainage. <http://www.bio.txstate.edu/tbonner/txfishes/Brazos.htm>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Galhardo, E., Donola, E. (1992a). Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética* 1: 39.
- Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F., Galhardo, E. (1992b). Monitoramento, manipulação e conservação genética de peixes. In: Agostinho, A.A., Benedito Cecilio, E. Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil. Editora Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil.
- Tortolero, S.A.R., Soares, M.C.F., Mera, P.A.S., Monteiro, J.M.F. (2010). Efeito da densidade de estocagem no crescimento do matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) em gaiolas de pequeno volume. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* 5: 81-92.
- Tundisi, J.G. (2003) Água no século XXI: enfrentando a escassez. RiMa/IIIE, São Carlos, Brasil.
- Uj, A. (1990). Etude comparative de l'osteologie cranienne dos poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
- Val, L.A., Almeida-Val, M.F. (1988). Adaptative features of amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon cf. cephalus* and *Brycon cf. erythopterus* (Pisces). *Revista Brasileira de Genética* 11: 27-39.
- Valente, G.T., Mazzuchelli, J., Ferreira, I.A., Poletto, A.B., Fantinatti, B.E.A., Martins, C. (2011). Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid

- fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetics Genome Research* 133: 34-42.
- Vandergon, T.L., Reitman, M. (1994). Evolution of chicken repeat 1 (CR1 elements): evidence for ancient subfamilies and multiple progenitors. *Molecular Biology Evolution* 11: 886-898.
- Vari, R.P. (1998). Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Vaz, M.M., Torquato, V.C., Barbosa, N.D.C. (2000). *Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande*. CEMIG/CETEC, Belo Horizonte, Brasil.
- Volff, J.N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94: 280-294.
- Volff, J.N., Körtling, C., Sweeney, K., Schartl, M. (1999). The non-LTR *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1427-1438.
- Volff, J.N., Körtling, C., Schartl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1673-1684.
- Volff, J.N., Körtling, C., Froschauer, A., Sweeney, K., Schartl, M. (2001). Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 52: 351-360.
- Volff, J.N., Bouneau, L., Ozouf-Costaz, C., Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics* 19: 674-678.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2000). Mapping 18S ribosomal gene in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology* 23: 135-138.
- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti PM (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2002). RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*. 474: 131-137.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2003). PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 109-113.
- Wasko, A.P., Martins, C., Wight, J.M., Galetti, P.M. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161-5.

- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A., Foresti, F. (2004). Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 48-52.
- Weitzman, S.H. (1960). Further notes on the relationships and classification of the South American characid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. *Stanford Ichthyology Bulletin* 7: 217-239.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A., Evers, H.G., Burns, J.R. (2005). Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 3: 329-360.
- Wender, U., Saint-Paul, U. (1978). Feeding trials with herbivorous and omnivorous Amazonian fishes. *Aquaculture* 15:175-177.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A.H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8: 973-982.
- Xiong, Y., Eickbush, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO Journal* 9: 3353-3362.
- Youngman, S., Van Luenen, H.G.A.M., Plasterk, R.H.A. (1996). TRE-1, a retrotransposon like element in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters* 380: 1-7.
- Zanata, A.M. (2000). Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Zaniboni-Filho, E., Resende, E.K. (1988). Anatomia de gônadas, escala de maturidade e tipo de desova do matrinchã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). *Revista Brasileira de Biologia* 48: 833-844.
- Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M. (2006). Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias* 19: 233-240.
- Zupunski, V., Gubensek, F., Korkis, D. (2001). Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1849-1863.