



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**ESTRUTURA CROMOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA
NO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Synbranchus marmoratus* (TELEOSTEI,
SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANCHIDAE).**

RICARDO UTSUNOMIA

**Botucatu/SP
Fevereiro/2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

RICARDO UTSUNOMIA

**ESTRUTURA CROMOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA
NO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Synbranchus marmoratus* (TELEOSTEI,
SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANCHIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, *campus* de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

**Botucatu/SP
Fevereiro/2013**

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

Utsunomia, Ricardo.

Estrutura cromossômica e caracterização cariotípica no complexo de espécies *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchiformes, Sunbranchidae) / Ricardo Utsunomia. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: José Carlos Pansonato Alves

Capes: 20204000

1. Peixe – Genética. 2. Citogenética. 3. Simbranquio. 4. Mapeamento cromossômico. 5. Sequência de nucleotídeos. 6. DNA.

Palavras-chave: Citogenética; Complexo de espécies; DNA repetitivo; *Synbranchus*.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus agradecimentos aos que, de alguma forma, contribuíram e auxiliaram na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Fausto Foresti, pelo exemplo como pessoa e pesquisador, pelos incentivos e por abrir as portas de seu Laboratório desde o nosso primeiro encontro.

Ao professor Dr. Cláudio de Oliveira pela agradável convivência diária e exemplo de pesquisador e dedicação ao trabalho.

Ao técnico Renato Devidé, pela convivência e disposição em ajudar nas coletas e preparações citogenéticas.

Ao amigo e co-orientador Dr. José Carlos Pansonato Alves pela convivência diária, ensinamentos, paciência, companheirismo e dedicação a seus alunos e amigos.

Aos amigos Ricardo Paiva e Guilherme José da Costa Silva pela amizade e pelos longos e valiosos ensinamentos e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos amigos da ala citogenética do Laboratório pelo companheirismo e amizade: Érica, Luciana, Maria Lígia, Patrícia Elda, Vanessa, Viviani, Cristian, Duílio, Marlon e Vander.

À todos os alunos e ex-alunos integrantes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes - Botucatu e do Laboratório de Genética de Peixes - Bauru que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar. Em especial ao Fernando F. Mendonça que me ajudou em muitas análises moleculares.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Biociências de Botucatu por proporcionar toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho. Em especial a todos os funcionários do Departamento de Morfologia e da Seção da Pós-Graduação que sempre nos atendem prontamente.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À toda minha família, em especial os meus pais Neide e Mitsuo e irmã Karen, que sempre me apoiaram e confiaram nas minhas decisões, amo vocês!

À minha namorada Priscilla por toda a paciência, dedicação e amor incondicional. Te amo!

Resumo

Complexos de espécies crípticas são grupos de espécies estreitamente relacionadas, dificilmente distinguíveis por características morfológicas. Estes complexos são conhecidos em uma significativa variedade de organismos, principalmente plantas, insetos, fungos e peixes. Em peixes, complexos de espécies já foram identificados para representantes de diferentes ordens, como Characiformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes. No presente estudo, foram analisadas amostras de *S. marmoratus* coletadas em oito localidades brasileiras distintas com o uso de técnicas citogenéticas clássicas (coloração convencional com Giemsa, localização das regiões organizadoras de nucléolo pela marcação com nitrato de Prata – AgNO₃ e bandamento C) e moleculares (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 18S, DNAhis H3, elemento transponível *Rex3* e sondas teloméricas). Além disso, análises moleculares foram realizadas utilizando dados de sequências de três genes mitocondriais (Citocromo B - CytB, Citocromo oxidase 1 - COI e DNAr 16S) de indivíduos com cariótipo conhecido. Considerando as amostras analisadas, números diploides distintos foram encontrados (42, 44 e 46 cromossomos) que, combinados com as fórmulas cariotípicas, resultam na distinção de cinco cariomorfos em *S. marmoratus*. A análise filogenética realizada confirma o *status* de complexo de espécies e revela que eventos múltiplos, possivelmente bidirecionais, seriam responsáveis pelo surgimento da variabilidade cariotípica neste grupo. O mapeamento físico do DNAr 5S revela que estes sítios se mantiveram conservados durante a história evolutiva de *Synbranchus*, enquanto que, de forma oposta, os sítios para DNAr 18S estão distribuídos de maneira polimórfica, com variações intrapopulacionais significativas, indicando que mecanismos evolutivos distintos estão agindo sobre a dispersão destas sequências. O mapeamento de DNAhis H3 revela sítios dispersos por todo o genoma em todos os cariomorfos analisados, que se apresentam na forma de *clusters*, com pequeno acúmulo em determinadas regiões cromossômicas. De forma semelhante, o elemento *Rex3* também revela distribuição dispersa, indicando que sequências repetitivas se organizam em diferentes modos no genoma das espécies deste complexo. Os resultados obtidos demonstraram que *S. marmoratus*, de fato, não constitui uma única espécie nominal, apontando para a necessidade de ampla revisão taxonômica neste grupo. Além disso, evidencia que os rearranjos cromossômicos podem, em alguns cariomorfos, atuar como principal mecanismo de diferenciação biológica, enquanto em outros, eventos não relacionados a variações cromossômicas ou invisíveis pela citogenética, podem promover a

diversidade. Adicionalmente, as análises indicam que os rearranjos cromossômicos responsáveis pela evolução cariotípica em *Synbranchus* ocorreram de forma independente nas distintas linhagens deste complexo, resultando em eventos possivelmente bidirecionais em relação ao aumento/redução do número diploide. Finalmente, os resultados mostram que abordagens integrativas em estudos evolutivos podem permitir uma interpretação mais adequada dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cariotípica e, conseqüentemente, sobre a história evolutiva deste grupo de organismos.

Abstract

Cryptic species complex are groups of species straightly related but hardly distinguished by morphological traits. These complexes are known to occur in a great variety of organisms, mainly plants, insects, yeasts and also fishes. Considering the fish group, species complex had already been identified in representatives from different orders, such as Characiformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes. In the present study, samples of *S. marmoratus* collected at eight different Brazilian sites were analyzed, using classical cytogenetic techniques (conventional staining with Giemsa, localization of nucleolar organizer regions with Silver nitrate staining - AgNO₃ and C-banding) and molecular (Fluorescence in situ hybridization with 5S and 18S rDNA, H3 DNAhis, transposable element *Rex3* and telomeric probes). Besides that, molecular analyses were carried out using sequence data from three mitochondrial genes (Cytochrome B – CytB, Cytochrome oxidase 1 – COI and 16S) obtained for each individual with known karyotype. Considering the analyzed samples, distinct diploid numbers were found (42, 44 and 46 chromosomes) and, associated with karyotype formulae, resulted in the distinction of five karyomorphs in *S. marmoratus*. The phylogenetic analyses confirmed the status of a species complex and revealed that multiple and, possibly bi-directional events were responsible the karyotypic variability found in this group. The physical mapping of 5S rDNA reveals that these sites kept conserved during the evolutionary history of *Synbranchus*, contrary to 18S rDNA sites which are distributed in a polymorphic way, with significant intrapopulational variability, indicating that distinct evolutionary mechanisms may be acting upon the dispersion of these sequences. The mapping of H3 hisDNA revealed a dispersed pattern of distribution of these sites on the genome of all karyomorphs, frequently found as little clusters accumulated in some chromosomal regions. In a similar way, the *Rex3* element also reveals a dispersed behavior, indicating that repetitive sequences are organized in different ways in the genome of these species complex. The results obtained demonstrated that *S. marmoratus*, in fact, do not constitute a single species, indicating that a taxonomic review is necessary in this group. Besides that, it highlights that chromosomal rearrangements can, in some cases, act as the main mechanism of biological differentiation, while in others, events that are not related to chromosomal variations or invisible to cytogenetic analysis, can promote the diversity. Additionally, the analyses indicate that the chromosomal rearrangements responsible for the karyotypic evolution in *Synbranchus* may occurred in an independent way in the distinct lineages of this complex, resulting in possibly bidirectional events in relation to the increase/decrease of diploid

numbers. Finally, the results show that integrative approaches in evolutionary studies may enable a more appropriate interpretation of the mechanisms involved in the differentiation process of karyotypes and, consequently, about the evolutionary history of this group of organisms.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Citogenética de Peixes Neotropicais: Caracterização da Biodiversidade e Evolução da Ictiofauna	1
1.2 O gênero <i>Synbranchus</i> : características taxonômicas e citogenéticas	4
2 Objetivos	6
3 Materiais e métodos	7
3.1 Materiais	7
3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta	7
3.2 Métodos	8
3.2.1 Estimulação de Mitoses	8
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos	9
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO ₃)	10
3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva	10
3.2.5 Extração de DNA genômico	11
3.2.6 Preparação das sondas de DNA para FISH	11
3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S	11
3.2.6.2 Preparação das sondas de DNHis H3	12
3.2.6.3 Preparação da sonda para elemento transponível <i>Rex3</i>	13
3.2.6.4 Preparação da sonda telomérica	14
3.2.7 Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	14
3.3 Estudos cariotípicos	15
3.4 Análises moleculares	16
3.4.1 Amplificação de genes mitocondriais e nucleares	16
3.4.2 Obtenção das sequências a partir dos produtos das reações de PCR	17
3.4.3 Análises filogenéticas	17
3.4.4 Análises de divergência genética	18

4 Resultados e Discussão	19
4.1 Capítulo 1- Complexo de espécies em <i>Synbranchus marmoratus</i> evidenciado por técnicas citogenéticas e moleculares	20
4.2 Capítulo 2- Mapeamento citogenético comparativo de sequências repetitivas em cariomorfos de <i>Synbranchus marmoratus</i> . Distintos modos de distribuição e organização nos genomas	39
5 Considerações finais	53
6 Referências Bibliográficas	55

1 Introdução

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

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos devido basicamente à utilização de técnicas mais resolutivas de análise cromossômica, o que tem possibilitado à citogenética contribuir mais efetivamente não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura e organização cromossômica nos vertebrados. Estes avanços técnicos têm se refletido também nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos. Na região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 espécies da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem a superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira *et al.*, 2007). Estes resultados mostram um aumento substancial das informações cariotípicas, se comparados ao levantamento realizado por Oliveira *et al.* (1988a). No entanto, tais dados são ainda incipientes se for considerado que podem existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nesta região biogeográfica (Reis *et al.*, 2003).

Em peixes, a aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de banda C e bandas de endonucleases de restrição, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Nos últimos anos, o desenvolvimento de sondas específicas de DNA possibilitou a hibridização destes marcadores em cromossomos metafásicos, através da técnica denominada FISH (Hibridação *in situ* Fluorescente). Este método é uma ferramenta interessante e permite correlacionar informações moleculares com a localização física de segmentos específicos nos cromossomos, obter informações mais precisas sobre a presença ou não de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas (Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Martins, 2007).

Os estudos citogenéticos em determinados grupos de peixes têm permitido um melhor esclarecimento sobre questões taxonômicas, avanços no entendimento da estrutura cromossômica, melhor compreensão sobre os processos carioevolutivos que envolvem os

grupos de peixes Neotropicais, bem como a identificação de espécies crípticas (Oliveira *et al.*, 2007).

Constatada em peixes pela primeira vez nos gêneros *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Astyanax* por Bertollo *et al.* (1986), a existência de complexos de espécies é caracterizada quando duas ou mais espécies estão classificadas sob o nome de uma única (Bickford *et al.*, 2007). Maistro *et al.* (1998) sugerem que os cariótipos de alguns grupos de peixes Neotropicais parecem ter evoluído a uma taxa mais alta em relação às modificações que ocorreram determinando as características morfológicas destes animais, resultando no surgimento de espécies crípticas. Posteriormente, diversos casos foram evidenciados como sendo pertencentes a estes complexos, incluindo componentes dos gêneros *Synbranchus* (Foresti *et al.*, 1992), *Serrasalmus* (Nakayama *et al.*, 2001), *Eigenmannia* (Moysés *et al.*, 2010), dentre outros.

Dentre os casos de espécies crípticas conhecidos na ictiofauna Neotropical, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) constitui-se num bom exemplo de estudo contínuo e amplo, tendo por base uma abordagem carioevolutiva. Análises citogenéticas realizadas no final da década de 70 evidenciaram uma extensa variabilidade cariotípica em uma única entidade taxonômica válida, *H. malabaricus*, com a existência de pelo menos sete cariomorfos distintos. Complementando o cenário de alta diversidade, também foi possível verificar a existência de distintos sistemas de cromossomos sexuais nesta espécie (Bertollo *et al.*, 2000). Assim, por meio do conhecimento sobre a distribuição geográfica, da macroestrutura cariotípica e dos padrões de heterocromatina constitutiva, foi possível estabelecer relações entre os distintos cariomorfos e elaborar hipóteses carioevolutivas. Posteriormente, estudos que envolveram o uso de FISH e pintura cromossômica permitiram corroborar algumas hipóteses de relações entre os cariomorfos e evidenciar novas situações, como a existência de um sistema de cromossomos sexuais em passos iniciais de diferenciação em amostras do cariomorfo C provenientes do estado do Mato Grosso (Ferreira *et al.*, 2007; Cioffi *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2010; Cioffi e Bertollo, 2010; Cioffi *et al.*, 2011).

A grande maioria dos estudos de componentes da ictiofauna Neotropical que utilizam a técnica de FISH envolve a localização de sondas constituídas por segmentos de DNA repetitivo. Este tipo de sequência é caracterizado por apresentar uma alta variabilidade e constitui uma fração considerável do genoma de muitos eucariotos (Wagner *et al.*, 1993; Charlesworth *et al.*, 1994), podendo ser classificado em três classes principais, 1) repetições *in tandem*, que inclui os DNAs satélites, minissatélites e microsatélites; 2) elementos transponíveis (TEs), que englobam transposons e retrotransposons; e 3) famílias multigênicas,

representadas por sequências repetidas codificadoras, como é o caso de genes ribossomais e histônicos (Sumner, 2003; Nagoda *et al.*, 2005).

O mapeamento cromossômico de sítios de DNA repetitivo vem sendo utilizado com sucesso nos estudos citogenéticos em peixes. A localização física de elementos transponíveis nos cromossomos mitóticos permitiu avanços no entendimento da dinâmica e evolução desta classe de DNA repetitivo. Através do mapeamento de elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* em peixes da família Loricariidae, Ferreira *et al.* (2011a) observaram, para ambos os elementos, um padrão de distribuição disperso em regiões eucromáticas e heterocromáticas, sugerindo que essas sequências estariam evoluindo juntas ou através do mesmo mecanismo. Por outro lado, mapeando os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em peixes ciclídeos, Valente *et al.* (2010) observaram as sequências distribuídas de modo disperso no genoma, bem como detectaram grandes blocos pericentroméricos marcados em algumas espécies, postulando que esses elementos seriam capazes de se acumular em regiões genômicas específicas dentro de cada grupo de peixes.

A detecção de repetições teloméricas também vem sendo utilizada com frequência, visando elucidar os processos envolvidos na evolução cariotípica em diferentes grupos. Estudando dois citótipos de *Gymnotus carapo* ($2n=40$ e $2n=42$ cromossomos), Milhomem *et al.* (2008) detectaram sítios teloméricos intersticiais (ITS) nos cromossomos do citótipo com $2n=40$, que possivelmente foram originados a partir de uma fusão cêntrica ocorrida no cromossomos do citótipo $2n=42$, sugerindo a existência de espécies crípticas neste grupo.

Além das abordagens citadas, o mapeamento físico de sequências repetitivas codificadoras também vem sendo realizado com sucesso no grupo dos peixes. Hashimoto *et al.* (2011), ao localizarem os genes para histonas H1 e DNAr 5S em três espécies do gênero *Astyanax*, afirmam que a presença destes genes em sintenia em um único par cromossômico seria uma condição comum para o gênero. Além disso, postulam que *A. bockmanni* e *A. fasciatus* seriam mais relacionadas entre si do que com *A. altiparanae* pelo fato de ambas as espécies possuírem clusters adicionais de DNAr 5S em um par de cromossomos acrocêntricos, característica não compartilhada pela última espécie. O sequenciamento dos genes confirmou os resultados filogenéticos obtidos pela citogenética.

Estudos como estes revelam características sobre a organização estrutural de determinadas sequências repetitivas e sua dinâmica no genoma dos organismos, revelando a importância do DNA repetitivo na evolução dos genomas dos eucariotos.

1.2 O gênero *Synbranchus*: características taxonômicas e citogenéticas.

O gênero *Synbranchus*, descrito primeiramente por Bloch (1795), está amplamente distribuído pelos cursos de água da América do Sul e América Central, mais especificamente desde o norte da Argentina até o México, incluindo diversas localidades brasileiras. Esse gênero está inserido na família Synbranchidae e contém atualmente três espécies válidas, identificadas como *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), *S. madeirae* (Rosen e Rumney, 1972), e *S. lampreia* (Favorito *et al.*, 2005). Esses peixes possuem o corpo longo, crânio alongado e marcante redução de nadadeiras e escamas. Por apresentarem tais características são popularmente conhecidos como enguias do brejo, muçum ou cobra d'água. Embora o gênero seja representado por apenas três espécies nominais, estudos anteriores detectaram a ocorrência de uma extensa variabilidade genética em *S. marmoratus*. Os indivíduos analisados até o presente momento apresentam uma macroestrutura cariotípica bastante variável, ocorrendo distintos cariomorfos que variam desde $2n=42$ até $2n=46$ cromossomos, caracterizando a existência de um complexo de espécies crípticas para esse grupo (Torres *et al.*, 2005). Além disso, a identificação de cromossomos marcadores em determinados cariomorfos (Foresti *et al.*, 1992), a presença de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) em diferentes cromossomos dos cariomorfos existentes (Melillo *et al.*, 1996) e até mesmo a possível ocorrência de cromossomos supranumerários (Sanchez e Fenocchio, 1996), evidenciam a grande variabilidade existente na estrutura cromossômica desses peixes.

As variações cariotípicas observadas em populações alopátricas (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2005) e até mesmo simpátricas (Torres *et al.*, 2005) de *S. marmoratus* estão relacionadas principalmente a eventos de rearranjos cromossômicos como fusões/fissões cêntricas e inversões pericêntricas, que teriam desempenhado um papel evolutivo importante na diferenciação cromossômica destes peixes. Melillo *et al.* (1996) consideraram o cariomorfo com $2n=42$ cromossomos como sendo o cariótipo ancestral para *S. marmoratus*, uma vez que constitui-se no cariomorfo mais recorrente nas localidades analisadas. Somado a este fato, *Monopterus albus*, representante da família Synbranchidae na China (Ji *et al.*, 2003), apresenta $2n=24$ cromossomos, o que reforça a ideia de condição ancestral para esse cariomorfo. Contudo, estudos recentes têm considerado outra hipótese. Levando-se em consideração que análises morfométricas (Favorito-Amorim, 1998) sugerem que o gênero *Ophisternon* seria grupo irmão primitivo de *Synbranchus*; que análises moleculares com a ausência do gênero *Ophisternon* sugerem que o gênero *Mastacembelus* seria grupo irmão de *Synbranchus* (Miya *et al.*, 2003) e que o cariótipo das espécies *O.*

bengalense, *M. Armatus* e *M. aculeatus* apresentam $2n=46$, $2n=48$ e $2n=48$ cromossomos, respectivamente (Oliveira *et al.*, 1997; Arkhipchuk, 1999; Liu *et al.*, 2002), com estrutura bem similar à de *S. marmoratus*, parece mais parcimonioso afirmar que o cariótipo ancestral de *S. marmoratus* seria aquele que possui $2n=46$ cromossomos e que esse teria dado origem, subsequentemente, aos cariomorfos com $2n=44$ e $2n=42$ cromossomos por meio de fusões cêntricas (Torres *et al.*, 2005).

Apesar da indefinição sobre os caminhos evolutivos percorridos pelo grupo, existem pelo menos cinco cariomorfos bem diferenciados e identificados até o presente momento e que podem ser subdivididos em dois grupos principais, de acordo com a presença ou não de cromossomos metacêntricos pequenos que ocorrem geralmente nos cariomorfos com $2n=44$ e $2n=46$ cromossomos (Melillo *et al.*, 1996). Além disso, Nakamoto *et al.* (1986) detectaram a existência de dois fenótipos distintos para tipos de hemoglobina nesses peixes, sendo um dos fenótipos característico dos indivíduos com $2n=44$ e $2n=46$ cromossomos, enquanto o outro fenótipo é coincidente com os indivíduos com $2n=42$ cromossomos, reforçando a ideia de separação em grupos e indicando uma maior proximidade genética entre os indivíduos dos cariomorfos com 44 e 46 cromossomos (Foresti *et al.*, 1992).

Além do alto grau de variabilidade cariotípica detectado em *S. marmoratus*, Melillo *et al.* (1996) encontraram uma extensa variabilidade na localização das RONS em diferentes cariomorfos. Apesar da variação detectada em relação a números diploides e regiões organizadoras de nucléolo, os autores constataram uma distribuição bastante conservada da heterocromatina constitutiva entre os diferentes cariomorfos, evidenciada como pequenos blocos apenas nas regiões dos centrômeros. No entanto, analisando populações de *S. marmoratus* provenientes de lagoas argentinas, Sánchez e Fenocchio (1996) detectaram, além de extensa variabilidade nas RONS, já descrita anteriormente, também um padrão de bandamento C bastante complexo, com a ocorrência de bandas pálidas ou brilhantes e dispersas pelo cariótipo, dando indícios da existência de diferentes classes de DNA repetitivo. Além disso, um dos indivíduos analisados por estes autores apresentou um cromossomo supranumerário heterocromático, com variação intraindividual de frequência. Estudos adicionais necessitam serem realizados para comprovar a distribuição e frequência deste cromossomo B na população, sendo esta a primeira referência de ocorrência de cromossomos supranumerários entre os representantes do gênero *Synbranchus*.

Nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aplicar técnicas citogenético-moleculares em diferentes amostras de *S. marmoratus* capturadas em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, buscando-se ampliar os dados

cariotípicos desta espécie e verificar os caminhos evolutivos percorridos por este grupo no seu processo de diferenciação, tendo por base as relações entre os diferentes cariomorfos existentes.

2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em desenvolver a análise citogenética de amostras da espécie *Synbranchus marmoratus*, com a finalidade de:

- a) ampliar o conhecimento sobre este grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorram em diferentes componentes de bacias hidrográficas brasileiras;
- b) verificar as relações filogenéticas entre os diferentes cariomorfos existentes por meio de técnicas citogenéticas e moleculares, com o intuito de hipotetizar os possíveis eventos responsáveis pelo surgimento desta variabilidade;
- c) caracterizar a distribuição de diferentes segmentos de DNA repetitivo com base na aplicação da técnica de FISH, visando verificar se este tipo de informação será útil e concordante com os dados moleculares de relações filogenéticas no grupo;
- d) identificar os possíveis mecanismos determinantes das modificações estruturais ocorridas no genoma dos componentes destes cariomorfos, no sentido de melhor compreender os processos envolvidos na diversificação do grupo.

3 Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

No presente trabalho foram analisados 75 exemplares da espécie de peixe *Synbranchus marmoratus* de ocorrência em 8 localidades distintas pertencentes a componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 1). De cada indivíduo analisado foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares posteriores. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Tabela 1. Exemplares de peixes do gênero *Synbranchus* analisados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Espécies	LBP	Localidade	N	Coordenadas
<i>S. marmoratus</i>	11356	Rio Piratini – Pedro Osório - RS	3	S 31° 52'31" W 52°48'58"
<i>S. marmoratus</i>	11364	Rio Paraná - Guaíra – PR	20	S 24°04'13" W 54°12'08"
<i>S. marmoratus</i>	11355	Rio Paraná- Bataguassu-MS	3	S 21°38'49" W 52°17'52"
<i>S. marmoratus</i>	11361	Rio Tietê – Igaráçu do Tietê-SP	15	S 22°34'43" W 48°27'48"
<i>S. marmoratus</i>	11365	Rio Mogi-Guaçu - Pirasununga-SP	18	S 21°55'41" W 47°22'85"
<i>S. marmoratus</i>	11362	Rio Grande - Icém-SP	8	S 20°20'13" W 49°07'56"
<i>S. marmoratus</i>	11357	Rio Paraguai - Cáceres-MT	5	S 16°02'69" W 57°40'52"
<i>S. marmoratus</i>		Rio Acre – Rio Branco-AC	3	S 57°54'97" W 67°44'41"

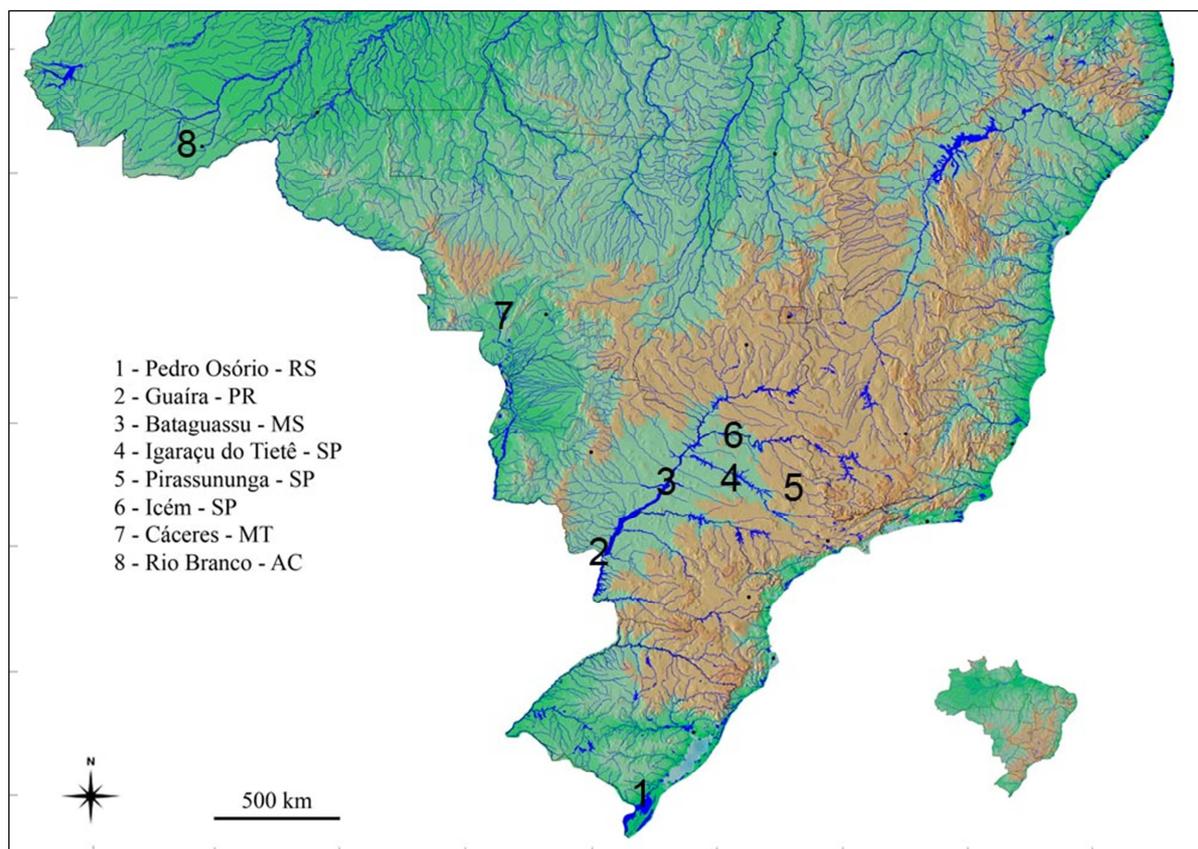


Figura 1. Mapa indicando os locais de coleta de amostras de *S. marmoratus*. 1 Rio Piratini, Pedro Osório – RS; 2 Rio Paraná, Guaíra – PR; 3 Rio Paraná, Bataguassu – MS; 4 Rio Tietê, Igarapu do Tietê – SP; 5 Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga – SP; 6 Rio Grande, Icém – SP; 7 Rio Paraguai, Cáceres – MT; 8 Rio Acre, Rio Branco – AC.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti *et al.*, 1993), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH com o intuito de localizar cromossomicamente seqüências de DNAr 5S e 18S, DNArhis H3 e elemento transponível *Rex3*.

3.2.1 Estimulação de Mitoses

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

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 10 minutos;
- 3) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado, por cerca de 48 horas.

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

3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

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

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

7) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;

8) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 minutos;

9) pingar o material em lâminas;

10) deixar secar ao ar.

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

3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO_3)

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

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

O procedimento para a coloração das RONs é o seguinte:

- 1) hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60°C;
- 2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3) deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos, a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;
- 4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos;
- 5) deixar secar ao ar.

3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

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

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

3.2.5 Extração de DNA genômico

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

3.2.6 Preparação das sondas de DNA para FISH

3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

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

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

94°C ---- 2 min
 34 ciclos { 95°C ---- 45 seg
 { 52,1°C ---- 45 seg
 { 72°C ---- 1 min e 30 seg
 72°C ---- 5 min
 12°C ---- manutenção

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Synbranchus marmoratus*, usando os primers 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás *et al.*, 1994b). Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR, a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 2 µl de Biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

95°C ---- 5 min
 34 ciclos { 95°C ---- 1 min
 { 55°C ---- 45 seg
 { 72°C ---- 1 min
 72°C ---- 7 min
 12°C ---- manutenção

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

3.2.6.2 Preparação das sondas de DNAs H3

A sonda de DNAs H3 foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Synbranchus marmoratus*, usando os primers H3 F (5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3') e H3 R (5'-ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC-3') (Colgan *et al.*, 1998). As sondas foram marcadas com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por

PCR, a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 2 µl de Biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min
31 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 20 \text{ seg} \\ 58^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 20 \text{ seg} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 30 \text{ seg} \end{array} \right.$
	72°C ---- 5 min
	12°C ---- manutenção

3.2.6.3 Preparação da sonda para elemento transponível *Rex3*

A sonda para elemento transponível *Rex3* foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Synbranchus marmoratus*, usando os primers *Rex3 F* (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e *Rex3 R* (5'-TGG CAG CAN GGG GTG GTG GT-3') (Volff *et al.*, 1999). A sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min
31 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 40 \text{ seg} \\ 55^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 40 \text{ seg} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 1 \text{ min e } 30 \text{ seg} \end{array} \right.$
	72°C ---- 5 min

12°C ---- manutenção

3.2.6.4 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ e os parâmetros para marcação foram: 33,9 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl Digoxigenina-11-dUTP, 1,5 µl de cada primer (10mM), 0,4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 10 min	
34 ciclos	{	94°C ---- 45 seg
		50°C ---- 1 min
		72°C ---- 1 min
	72°C ---- 7 min	
	12°C ---- manutenção	

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

3.2.7 Hibridação *in situ* Fluorescente

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

Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em

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

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 4xSSC e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio, 3 µL de antidigoxi- rodamina e 3 µL de avidina-FITC) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.3 Estudos Cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridação *in situ* fluorescente foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número

diploide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime) presente em cada espécie/população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos), coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

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

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Amplificação de genes mitocondriais e nucleares

Considerando que estudos que envolvam o mapeamento físico de sequências histônicas e de elementos transponíveis são escassos em peixes, sequências foram geradas a partir dos produtos das reações de PCR que utilizaram os primers de DNAhis H3 e H4 e elemento transponível *Rex3*, com o objetivo de confirmar o conteúdo genético das sondas utilizadas.

Análises filogenéticas e populacionais compreenderam, pelo menos, 3 indivíduos com cariomorfos previamente caracterizados de cada localidade e foram realizadas a partir de sequências parciais dos genes mitocondriais COI, 16S e Citocromo B, amplificadas por PCR utilizando, respectivamente, os primers FishF1 (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') e FishR1 (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3') (Ward *et al.* 2005), Cyt b L14841=5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' e Cyt b H 15915=5' AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC 3' (Kocher *et al.*, 1989), 16Sar=5' ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT 3' e 16Sbr=5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3' (Kocher *et al.*, 1989).. Os parâmetros para a amplificação foram: 35,5 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (2mM cada), 1µl de cada primer (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

94°C ---- 2 min
34 ciclos { 95°C ---- 45 seg
 { 54°C ---- 45 seg
 { 72°C ---- 1 min
72°C ---- 5 min
12°C ---- manutenção

3.4.2 Obtenção das sequências a partir dos produtos das reações de PCR

Após a amplificação o produto de PCR foi purificado usando ExoSap-IT® (USB Corporation) seguindo as instruções do fabricante. O produto da PCR purificado foi usado para montar uma reação de sequenciamento com o kit BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Life Technologies) submetido ao programa presente no manual do kit. O produto desta reação foi purificado com a adição, por reação, de 0,7ul de acetato de sódio (3M), 0,7ul de EDTA (125mM) e 17,5ul de etanol 100%. Essa mistura foi encubada por 15 minutos e, em seguida, levada para uma centrifugação de 15 minutos a 13000rpm. Logo após, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 24ul de etanol 70%. Essa nova mistura foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos a 13000rpm e após esta centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado. O restante do álcool presente no tubo foi evaporado sob temperatura de 90°C por 8 minutos. Após essas etapas, as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. Com o término do sequenciamento, as sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência consenso dos genes em questão. Todos os consensos das amostras foram colocados em um mesmo arquivo de texto que posteriormente passou por um processo de alinhamento pelo algoritmo MUSCLE disponível *online* no *link* <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>.

3.4.3 Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas um teste de saturação foi realizado no programa DAMBE versão 5.1.1, a partir da relação entre transição e transversão. A análise de distância por Neighbor Joining (NJ) foi realizada no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), com o modelo de distância de Kimura 2 Parâmetros. Como teste estatístico para essa análise foi adotado o método de Bootstrap (Felsenstein, 1985), com 1000 pseudoréplicas. A análise

filogenética pelo método da Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com a ferramenta RAxML-HPC2 em XSEDE (Stamatakis *et al.*, 2008). O teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas foi utilizado como teste estatístico da filogenia. Nestas análises os gaps foram tratados como dados perdidos e as mutações (tanto em relação à posição no códon quanto às transições e transversões) tiveram a mesma pesagem.

3.4.4 Análises de divergência genética

Para as análises de divergência genética foram calculadas as composições nucleotídicas, diversidade das sequências, número de sites polimórficos, número de frequência e diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.01 de Excoffier & Schneider (2005). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN 3.01 que utiliza a estatística F de Wrigth's (1951, 1965). A significância da F_{ST} - estatística é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992), com 1000 permutações. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões. A rede de haplótipos foi estimada utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), que utiliza os métodos de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992).

4 Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em amostras de *S. marmoratus* foram organizadas na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir.

Capítulo 1

Complexo de espécies em *Synbranchus marmoratus* evidenciado por técnicas citogenéticas e moleculares.

Capítulo 2

Mapeamento citogenético comparativo de sequências repetitivas em cariomorfos de *Synbranchus marmoratus*. Distintos modos de distribuição e organização nos genomas.

Capítulo 1

Complexo de espécies em *Synbranchus marmoratus* evidenciado por técnicas citogenéticas e moleculares

Resumo

Complexos de espécies crípticas são grupos de espécies estreitamente relacionadas que são difíceis ou impossíveis de se distinguir por características morfológicas. Em peixes, complexos de espécies já foram identificados em representantes de diversos grupos. Inseridos na ordem dos Synbranchiformes, a espécie *Synbranchus marmoratus* já foi relatada como um complexo de espécies devido à existência de uma alta variabilidade cariotípica intraespecífica. No presente estudo, nós analisamos citogeneticamente 75 amostras de *S. marmoratus* coletadas em oito localidades brasileiras distintas. Os resultados obtidos evidenciaram variações relacionadas a números diploides e fórmulas cariotípicas, com cariótipos apresentando $2n=42$ (Cariomorfos A e B), $2n=44$ (Cariomorfo C) e $2n=46$ cromossomos (Cariomorfos D e E). Adicionalmente, para cada uma das amostras com cariótipo conhecido, análises moleculares foram realizadas por meio do sequenciamento parcial dos genes mitocondriais Citocromo oxidase *c* subunidade I (COI), 16S e Citocromo *b* (CytB), revelando entre os cariomorfos, índices de divergências nucleotídicas compatíveis com espécies distintas. Desta forma, *S. marmoratus*, de fato, não constitui uma única espécie nominal, apontando para a necessidade de ampla revisão taxonômica neste grupo. Além disso, foram levantadas evidências de que os rearranjos cromossômicos podem, em alguns cariomorfos, atuar como principal mecanismo de diferenciação biológica, enquanto em outros casos, eventos não relacionados à variações cromossômicas ou imperceptíveis pela citogenética clássica, podem promover a diversidade. Tais análises indicam que os rearranjos cromossômicos responsáveis pela evolução cariotípica em *Synbranchus* ocorreram de forma independente nas distintas linhagens deste complexo, resultando em eventos possivelmente bidirecionais em relação ao aumento/redução dos números diploides. A integralização de diferentes abordagens permitiram uma interpretação mais adequada dos processos evolutivos envolvidos na diferenciação do gênero *Synbranchus* e contribuíram, ainda, para a ampliação do conhecimento da diversidade dos peixes Neotropicais.

Introdução

Complexos de espécies crípticas podem ser definidos como grupos de duas ou mais espécies classificadas como uma única (Bickford *et al.*, 2007). Uma premissa para sua origem seria o surgimento de isolamento reprodutivo intraespecífico, que poderia ocorrer de forma pré-zigótica, como incompatibilidade gamética e/ou isolamento ecológico (Miyatake e Shimizu, 1999, Landry *et al.*, 2003) ou pós-zigótica, como inviabilidade genética do híbrido e/ou seleção sexual contra híbridos (Orr, 1995; Noor *et al.*, 2001; Presgraves *et al.*, 2003). De forma geral, tais eventos tendem a ocorrer em organismos com pouca ou nenhuma mobilidade, o que faz das plantas (Steven e Subramanyam, 2009), insetos (Campbell *et al.*, 1994), fungos (Theodoro *et al.*, 2008), pequenos mamíferos (Green *et al.*, 1980), anfíbios (Kozak *et al.*, 2006) e alguns peixes (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Bertollo *et al.*, 2000) organismos modelos para estudos desta natureza. Embora as diferenças morfológicas aparentes sejam reduzidas em muitos casos, características observadas nos padrões de comportamento (Crossley, 1986; Gilbert e Walsh, 2005), na estrutura cariotípica (Haga e Noda, 1976; Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Ruiz e Wasserman, 1993; Dobigny *et al.*, 2002; Amaro *et al.*, 2012), nas variações de proteínas (Nakamoto *et al.*, 1986; Fong e Garthwaite, 1994) e/ou sequências de DNA (Kazan *et al.*, 1993; Hebert *et al.*, 2004) podem ser utilizadas e permitem uma primeira abordagem para a identificação destes complexos.

Os peixes Neotropicais constituem um excelente modelo para o estudo de espécies crípticas, pois a distribuição e irradiação destes organismos em proporções continentais, contrastada com a capacidade de formar populações isoladas e endêmicas podem culminar em diferenciação alopátrica (Lundberg *et al.*, 1998; Ribeiro, 2006). Adicionalmente, eventos aleatórios, naturais ou não, que possam contribuir para a mistura de faunas, como capturas de cabeceira e/ou desvios de cursos d'água, podem levar ao contato secundário destas amostras (Blanco *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2009) e compor um cenário ideal para o estudo de complexos de espécies. Em representantes de diferentes ordens de peixes, como Characiformes, Synbranchiformes e Gymnotiformes, estes complexos já foram identificados (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Torres *et al.*, 2005; Milhomem *et al.*, 2008).

Os peixes pertencentes ao gênero *Synbranchus* (Synbranchiformes, Synbranchidae) estão atualmente divididos em três espécies válidas: *S. madeirae*, restrito à bacia do rio Madeira (Rosen e Rumney, 1972), *S. lampreia*, restrito à ilha de Marajó (Favorito *et al.*, 2005) e *S. marmoratus*, amplamente distribuído pela América do Sul e Central (Rosen e Rumney, 1972). Nesta última espécie, *S. marmoratus*, apesar de seus representantes caracterizarem uma única entidade taxonômica válida, são encontradas populações com uma extensa diversidade cariotípica, com números diploides variando desde 42 até 46

cromossomos, bem como variações na morfologia cromossômica, na distribuição da heterocromatina constitutiva e na localização dos sítios de DNAr (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sanchez e Fenocchio, 1996; Torres *et al.*, 2005). Embora a distinção de grupos em *S. marmoratus* (cariomorfos) a partir de ferramentas citogenéticas seja relativamente simples (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sanchez e Fenocchio, 1996; Torres *et al.*, 2005), a caracterização destes grupos do ponto de vista morfológico nem sempre é possível (Rosen e Rumney, 1972), o que dificulta a caracterização de novas espécies. Por outro lado, a análise da estrutura cariotípica pode ser limitante, pois apesar de fornecer evidências sobre o processo de diversificação cromossômica e dos possíveis rearranjos que acompanharam esta diferenciação, a ordem cronológica em que tais eventos ocorreram e as relações de proximidade entre os cariomorfos não pode ser determinada.

Considerando a ampla distribuição de *S. marmoratus* pelos componentes hidrográficos das Américas do Sul e Central, o presente estudo propôs-se a caracterizar citogeneticamente distintas amostras desta espécie e identificá-las do ponto de vista molecular utilizando as sequências do DNA mitocondrial COI, CytB e 16S, buscando avaliar a existência de espécies distintas sob um mesmo nome, posicionar filogeneticamente estas amostras e investigar o histórico dos rearranjos cromossômicos que ocorreram em representantes de *S. marmoratus*.

Materiais e métodos

Amostras analisadas

No presente trabalho foram analisadas um total de 75 amostras de *S. marmoratus* coletadas em ambiente natural e provenientes de sete localidades brasileiras (Figura 1, Tabela 1). Os exemplares foram identificados segundo Rosen e Greenwood (1976). Dois indivíduos da espécie *Ophisternon aenigmaticum* provenientes de Isla Margarita – Venezuela, foram incluídos nas análises moleculares para a caracterização de um grupo externo. Os exemplares analisados foram fixados em formalina 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil. Os detalhes sobre os números de cada lote estão representados na Tabela 1.

Análises citogenéticas

Preparações e bandamentos cromossômicos

Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína e sacrificados para análise citogenética. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal com base no protocolo da técnica referida em Foresti *et al.* (1993). Para localização da heterocromatina constitutiva, a técnica de bandamento-C foi utilizada seguindo o protocolo estabelecido por Sumner (1972).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Hibridação *in situ* fluorescente e preparação de sonda telomérica

Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986) foram realizados para mapear sequências teloméricas. Para a obtenção desta sonda, uma reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) usando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ foi realizada (Ijdo *et al.*, 1991). Para a marcação da sonda, uma nova reação foi realizada adicionando o fluorocromo digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science), sendo os sinais de hibridação detectados com o uso de anti-digoxigenina rodamina conjugada.

Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX61). As imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus 6.0 software (MediaCybernetics).

Análises moleculares

Para extração do DNA o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) foi utilizado conforme instruções do fabricante. Para a análise molecular foram utilizadas sequências parciais do gene mitocondrial COI utilizando os primers descritos por Ward *et al.* (2005) e sequências dos genes CytB e 16S utilizando os primers descritos por Kocher *et al.* (1989). Os produtos de PCR foram purificados usando ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo as instruções do fabricante e usados para montar reações de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), submetido ao programa presente no manual do kit. Os produtos destas reações foram purificados e as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade Applied Biosystems 3130. As sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência consenso.

As sequências consenso foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) gerando uma matriz para cada segmento gênico que posteriormente foram concatenadas formando uma só matriz. Essa matriz foi dividida em sete partições e o modelo de partição adotado foi o modelo de gene e posição, no qual uma partição corresponde ao 16S e as outras seis partições correspondem às três posições dos códons dos genes COI e CytB.

O teste de saturação da matriz foi realizado para no programa DAMBE versão 5.1.1 pelo teste de Xia *et al.* (2003). A busca do melhor modelo de evolução nucleotídica para cada partição foi realizado no modeltest 3.6 (Posada e Crandall, 1998). A análise filogenética pelo método da Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com a ferramenta RAxML-HPC2 em XSEDE (Stamatakis *et al.*, 2008). O teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas foi utilizado como teste estatístico da filogenia.

Para as análises de divergência genética foram calculadas as composições nucleotídicas, diversidade das sequências, número de sítios polimórficos, número de frequência e diversidade de haplótipos usando o programa ARLEQUIN versão 3.01 de Excoffier e Schneider (2005). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética espacial entre os haplótipos do DNA mitocondrial (DNAm_t) utilizando o programa ARLEQUIN 3.01 que baseia-se na estatística *F* de Wrigth's (1951, 1965). A significância da F_{ST} - estatística é determinada pelas permutações não-paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992), com 1000 permutações. As regiões geográficas mais próximas foram agrupadas para avaliar a heterogeneidade genética dentro e entre as regiões e em pares de regiões. A rede de haplótipos foi estimada utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), que utiliza os métodos de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992).

Além disso, uma análise de distância genética par-a-par entre os diferentes cariomorfos de distintas localidades foi efetuada a partir das sequências do gene COI, utilizando o método de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). Esta análise foi realizada para uma comparação com o sistema *Barcode of Life*.

Resultados

Análises citogenéticas

Nas análises citogenéticas o procedimento de coloração convencional por Giemsa revelou a existência de indivíduos com $2n=42$ (4m + 12st + 26a), nomeado cariomorfo A (Figura 2a); $2n=42$ (6m + 10st + 26a), nomeado cariomorfo B (Figura 2b); $2n=44$ (4m + 12st

+ 28a), nomeado cariomorfo C (Figura 3a, 3b); $2n=46$ (6m + 8st + 32a), nomeado cariomorfo D (Figura 4a) e $2n=46$ (6m + 8st + 32a), nomeado cariomorfo E (Figura 4b). Os locais onde os cariomorfos foram coletados estão sumarizados na Tabela 1. O bandamento-C revelou marcações centroméricas nos cromossomos de todos os cariomorfos analisados, além de marcações intersticiais em alguns pares cromossômicos de alguns cariomorfos (Figuras 2c, 2d, 3c, 3d, 4c, 4d). As fórmulas cariotípicas e os padrões de bandamento encontrados estão representados no ideograma (Figura 7). A FISH utilizando sondas teloméricas não revelaram qualquer sinal intersticial nos cromossomos de todos os exemplares analisados (Dados não mostrados).

Análises moleculares

Na caracterização nucleotídica dos genes mitocondriais 16S, CytB e COI, entre as 46 amostras sequenciadas foram obtidos 2.150 bases analisáveis com a identificação de 408 sítios polimórficos, originando 25 haplótipos distintos com diversidade nucleotídica $\pi=0.506$ e diversidade haplotípica $Hd=0.958$. As maiores diversidades genéticas foram observadas para o gene CytB e as menores diversidades foram caracterizadas para o gene 16S (Tabela 2).

A partir das análises filogenéticas realizadas, uma topologia foi resgatada (Figura 5) que, de modo geral, apresenta um elevado suporte estatístico para os diferentes nós. As análises filogenéticas demonstram um complexo cenário biogeográfico, com diferentes cariomorfos convivendo em simpatria e um mesmo cariomorfo presente em diferentes localidades. Além disso, é possível verificar que cariomorfos com um mesmo número diploide não formam, necessariamente, grupos monofiléticos.

Para as análises de Variância Molecular (AMOVA) as amostras de *S. marmoratus* também foram agrupadas de acordo com os 5 cariomorfos encontrados. Nas simulações de maior e menor similaridade entre os cariomorfos os maiores índices de divergência nucleotídica foram observados nas análises entre grupos, sendo a maior variação (82%) para os genes CytB e 16S e a menor variação (56%) no gene 16S. Dentro dos grupos a maior divergência foi observada no gene CytB com 2.13% e a menor divergência no gene 16S com apenas 0.72%. Na análise que utiliza a estatística F de Wrigth's (1951, 1965) para a estimativa de estruturação entre todos os cariomorfos, a partir do gene 16S foi observado um índice de fixação $\Phi_{ST}=0.9879$. Para o gene COI o índice foi de $\Phi_{ST}=0.9862$ e para o gene CytB o índice de fixação foi de $\Phi_{ST}=0.9715$.

Nas redes de haplótipos geradas para os três genes de estudo são observados os compartilhamentos de haplótipos apenas entre os cariomorfos A e B obtidos nas regiões de Bataguassu e Guaíra. Os demais cariomorfos apresentam haplótipos exclusivos separados por diversos passos mutacionais, conforme apresentados na Figura 6.

As distâncias genéticas médias observadas estão representadas na tabela III, sendo os maiores valores observados entre os cariomorfos E – Pirassununga e C – Rio Branco (0,115) e os menores entre os cariomorfos A – Bataguassu e B – Guaíra (Tabela III).

Discussão

As diferenças morfológicas entre as espécies relacionadas na ordem Synbranchiformes são comumente utilizadas em estudos sistemáticos e biogeográficos (Rosen e Rumney, 1972; Rosen e Greenwood, 1976; Favorito *et al.*, 2005). No entanto, a sutileza e a ambiguidade de determinados caracteres morfológicos geralmente dificultam o processo de descrição e reconhecimento de espécies. Neste sentido, o uso de ferramentas adicionais para uma melhor caracterização e delimitação dos representantes deste grupo se faz necessário (Nakamoto *et al.*, 1986; Foresti *et al.*, 1992; Sánchez e Fenocchio, 1996; Melillo *et al.*, 1996; Perdices *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Nirchio *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012). No presente trabalho, os dados obtidos permitiram confirmar que, de fato, *S. marmoratus* constitui uma espécie críptica, como já sugerido por Torres *et al.* (2005).

O fato de diferentes cariomorfos serem coletados em simpatria em distintas localidades e a não constatação de indivíduos híbridos reforça a hipótese da ocorrência de um complexo de espécies. Os testes estatísticos realizados indicam a inexistência de fluxo gênico entre as amostras simpátricas encontradas em Igarapu do Tietê, Icém e Pirassununga. Ainda, a divergência haplotípica *Ophisternon/Synbranchus* observada é, em muitos casos, menor do que *Synbranchus/Synbranchus* (Figura 6). Além disso, levando em consideração apenas as sequências do gene COI, as distâncias genéticas entre cariomorfos é, em média, bastante superior a 2%, valor heurístico encontrado entre diferentes espécies de um mesmo gênero por Ward *et al.* (2005), com exceção aos valores observados entre os cariomorfos A (Bataguassu) e B (Guaíra). Por tais razões, nossos dados apontam para a existência de espécies distintas sob uma mesma classificação (*S. marmoratus*) e sinalizam para a necessidade de uma extensa revisão sistemática deste grupo.

Dada esta necessidade, o conhecimento sobre a distribuição geográfica de indivíduos pertencentes a este grupo é essencial e surge como um impasse, pois, espécies deste gênero são amplamente utilizadas comercialmente na forma de iscas para pesca esportiva, o que

pode resultar em extensos, múltiplos e problemáticos casos de introdução artificial. Como consequência da transposição destes peixes, podemos apontar o exemplo dos indivíduos pertencentes ao cariomorfo A coletados na bacia do rio Paraguai (Cáceres), que se posicionam em dois ramos internos distintos, entre os indivíduos provenientes da bacia do alto rio Paraná (Icém e Igarapu) e ao lado dos indivíduos coletados no rio Paraná (Figura 5). Estes animais estão separados por centenas de quilômetros de distância e são muito semelhantes do ponto de vista genético. Considerando que a região de Cáceres é muito apreciada por praticantes de pesca esportiva, estes animais podem ter sido levados como iscas a partir de amostras do rio Tietê, justificando a similaridade genética observada. A ocorrência destes eventos de transposição de amostras acaba por comprometer a realização de estudos biogeográficos e históricos neste grupo. Por outro lado, nossos dados apontam para a importância da integralização de dados citogenéticos e moleculares para uma melhor classificação deste gênero, bem como de dados comportamentais e ambientais, conforme proposto por Schlik *et al.* (2010).

As análises moleculares realizadas evidenciaram a existência de dois clados principais em *S. marmoratus* (I e II), no qual o primeiro ainda pode ser subdividido em outros quatro subclados (IA, IB, IC, ID). No entanto, deve-se notar que, considerando tal classificação, não é possível verificar uma estruturação geográfica lógica para esta espécie, situação já constatada anteriormente em amostras de *S. marmoratus* provenientes da América Central (Perdices *et al.*, 2005). Tal fato poderia estar relacionado à variabilidade cariotípica existente nesta espécie (Torres *et al.*, 2005).

Embora o caráter polimórfico da estrutura cariotípica das amostras analisadas possa justificar a incongruência entre os dados filogenéticos e de distribuição geográfica, as subdivisões dos clados principais também não correspondem, em sua totalidade, aos cinco cariomorfos descritos de forma recíproca. Assim, é possível verificar que os subclados IA e IC são compostos por indivíduos pertencentes a um mesmo cariomorfo (A); o subclado IB é composto por indivíduos pertencentes a diferentes cariomorfos (A e B); o subclado ID apresenta indivíduos pertencentes somente ao cariomorfo D; enquanto o clado II é composto por indivíduos pertencentes aos cariomorfos C e E (Figura 5).

A relação entre rearranjos cromossômicos e especiação é um debate extenso e controverso (Trickett e Butlin, 1994; Noor *et al.*, 2001; Rieseberg 2001; Kirkpatrick e Barton, 2006; Hoffman e Rieseberg, 2008; Faria e Navarro, 2010). Embora não tenhamos evidências suficientes para afirmar se as alterações cromossômicas seriam a causa ou consequência da especiação em *Synbranchus*, é possível verificar no subclado IB que dois

cariomorfos distintos (A e B) provenientes de localidades próximas se sobrepõem na análise filogenética e compartilham de um mesmo haplótipo. Basicamente, o polimorfismo cariotípico entre ambas as amostras se dá pela presença de um pequeno par de cromossomos metacêntricos no cariomorfo B e ausentes nas células dos indivíduos do cariomorfo A, que teriam surgido, provavelmente, após a ocorrência de uma inversão pericêntrica em um cromossomo submetacêntrico (Figura 2a e 2b). Nesse sentido, hipotetizamos que, em uma parcela de determinada população nestas proximidades, este rearranjo tenha ocorrido e dado origem à variante Cariomorfo B. Assim, caso esta modificação não acarrete em qualquer tipo de seleção negativa, este rearranjo pode se espalhar e se fixar na população, resultando no surgimento de um novo cariomorfo. Embora a busca por indivíduos de localidades intermediárias entre estes locais de coleta seja importante, nós evidenciamos que um rearranjo cromossômico recente precederia um possível caso de especiação, atuando como um primeiro estágio de diferenciação genética entre os cariomorfos A e B.

A ocorrência de espécies com números diploides distintos em Synbranchidae revela que rearranjos que alteram os números diploides são mecanismos fundamentais na diferenciação cariotípica neste grupo (Torres *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2012). Baseado nesta hipótese, a condição cariotípica ancestral e os rearranjos subsequentes que levaram ao aparecimento dos mais diversos cariomorfos também devem ser investigados.

Especulações sobre o número diploide primitivo em *Synbranchus* já foram levantadas e, aparentemente, levam a formulações opostas. Melillo *et al.* (1996) consideram que o número diploide mais primitivo em *S. marmoratus* seria $2n=42$ por estar mais difundido nas diferentes bacias hidrográficas brasileiras e que fissões cêntricas seriam responsáveis pelo aparecimento de cariomorfos com números diploides elevados. Por outro lado, considerando os números cromossômicos de espécies basais próximas a *Synbranchus* (*Ophisternon* e *Mastacembelus*), Torres *et al.* (2005) sugeriram uma sucessão de eventos inversa, indicando que fusões cêntricas seriam os principais mecanismos de evolução neste grupo.

Embora o conhecimento sobre números diploides possa ajudar a compreender a diversificação e irradiação de determinados organismos, é possível verificar que no gênero *Synbranchus* este tipo de análise ainda não é resolutiva. Tal afirmação se baseia na observação de que, quando plotadas as informações cariotípicas de *S. marmoratus* na árvore filogenética, nota-se que a carioevolução neste grupo de peixes não segue um padrão linear, conduzida para situações de redução ou de aumento do número diploide. Diante disso, os dados do presente trabalho permitem a elaboração de uma proposta alternativa sobre os padrões de diferenciação cromossômica em *Synbranchus*.

Embora a adoção de um cariomorfo ancestral não seja possível, o que inviabiliza sugerir, com segurança, as sequências de rearranjos cromossômicos que originaram a maioria dos cariomorfos observados, nossas análises revelam que eventos citogenéticos homoplásticos ocorreram em *S. marmoratus* e estão relacionados à origem dos diferentes cariomorfos que apresentam $2n=44$ (Cariomorfo C) e $2n=46$ (cariomorfos D e E). Assim, um evento de fusão cromossômica poderia ter dado origem aos cariomorfos que apresentam $2n=44$ e uma posterior reversão (fissão cromossômica) teria reestabelecido o número diploide para $2n=46$ (cariomorfo E) ou então, as amostras pertencentes ao cariomorfo C se originaram de forma paralela por meio de fusões independentes. Apesar desta indefinição, é importante constatar que uma destas homoplasias ocorreu. Nesse sentido, nós hipotetizamos que rearranjos independentes e possivelmente bidirecionais (fusões e ou fissões) foram responsáveis pelo surgimento de distintos números diploides e fórmulas cariotípicas observados neste complexo de espécies. Além disso, também é possível verificar conjuntos de indivíduos que apresentam uma profunda divergência genética entre si, porém, aparentam representar um único cariomorfo, caso do cariomorfo A, presente simultaneamente nos subclados IA, IB e IC (Figura 5), com destaque aos indivíduos do subclado IC, distantes acima de 2% dos outros clados. Por tais razões, destaca-se que a utilização indiscriminada das informações cariotípicas (e.g. números diploides) como ferramenta para entender a carioevolução deste grupo tende a ser arriscada.

A constatação de cromossomos marcadores específicos presentes em alguns cariomorfos, identificados pela sua morfologia ou características de bandamento, poderia dar indicações sobre os elementos genômicos envolvidos nos rearranjos ocorridos durante a história evolutiva de *Synbranchus* e, desta forma, colaborar no entendimento das relações filogenéticas deste grupo. Nesse sentido, podem ser destacadas as características do segundo par metacêntrico que possui um bloco heterocromático no braço longo, presente nos cariomorfos A e B e o primeiro par submetacêntrico, que possui dois blocos de heterocromatina no braço longo, presente nos cariomorfos A, B, C e E. No entanto, a constatação da presença de cromossomos semelhantes em linhagens distintas, caso do pequeno par metacêntrico presente nos cariomorfos B, C, D e E, cujo surgimento no cariomorfo B foi demonstrado ser independente dos outros (Presente trabalho), levantam a questão de existência ou não de homologia entre estes cromossomos, destacando novamente o risco do uso avulso destes marcadores como ferramentas para estudos evolutivos. Nesse sentido, experimentos envolvendo microdissecção e pintura cromossômica poderão indicar

quais cromossomos estiveram envolvidos em determinados rearranjos, tal como avaliar o nível de homologia presente entre todos esses cromossomos mencionados.

Referências

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

Tabela 1: Relação de exemplares de *S. marmoratus* analisados. LBP: Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências – UNESP.

Localidade	Bacia	Rio	N	Cariomorfo	Mapa	Coordenada	LBP
Pedro Osório	Lagoa Mirim	Piratini	3	C(3)	1	31°52'31" S – 52°48'58" O	11356
Guáira	Paraná	Paraná	20	B(20)	2	24°04'13" S – 54°12'08" O	11364
Bataguassu	Paraná	Paraná	3	A(3)	3	21°38'49" S – 52°17'52" O	11355
Igarapu do Tietê	Tietê	Tietê	15	A (13)/ E(2)	4	22°34'43" S – 48°27'48" O	11361
Pirassununga	Grande	Mogi-Guaçu	18	A(11)/ D(2)/ E(5)	5	21°55'41" S – 47°22'85" O	11365
Icém	Grande	Grande	8	A(6)/ D(2)	6	20°20'13" S - 49°07'56" O	11362
Cáceres	Paraguai	Paraguai	5	A(5)	7	16°02'29" S - 57°40'52" O	11357
Rio Branco	Amazonas	Acre	3	C(3)	8	57°54'94" S - 67°44'41" O	

Tabela 2: Caracterização nucleotídica dos genes mitocondriais 16S, COI e CytB em *S. marmoratus*.

	16S	COI	CytB	Total
Número nucleotídeos	574	642	934	2150
Sítios polimórficos	48	161	250	437
Número haplótipos	13	19	21	25
Divers nucleotídica	0.0224	0.0624	0.0687	0.567
Divers haplotípica	0.920	0.943	0.957	0.963

Tabela 3: Matriz de distância genética entre os diferentes cariomorfos elaborada utilizando as sequências do gene COI e o modelo de substituição Kimura-2-parâmetros.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Cariomorfo A - Bataguassu											
2. Cariomorfo A - Caceres	0,015										
3. Cariomorfo A - Icem	0,015	0,003									
4. Cariomorfo A - Igaracu	0,014	0,006	0,006								
5. Cariomorfo A - Pirassununga	0,03	0,027	0,027	0,026							
6. Cariomorfo B	0,002	0,016	0,017	0,015	0,03						
7. Cariomorfo C - Cerrito	0,108	0,102	0,102	0,097	0,104	0,109					
8. Cariomorfo C - Rio Branco	0,091	0,09	0,094	0,089	0,098	0,091	0,108				
9. Cariomorfo D	0,088	0,097	0,097	0,096	0,098	0,088	0,1	0,094			
10. Cariomorfo E - Igaracu	0,076	0,084	0,084	0,078	0,084	0,077	0,04	0,106	0,09		
11. Cariomorfo E - Pirassununga	0,081	0,083	0,083	0,082	0,083	0,082	0,047	0,115	0,09	0,021	
12. Ophisternon	0,175	0,172	0,177	0,175	0,176	0,174	0,201	0,204	0,203	0,199	0,193

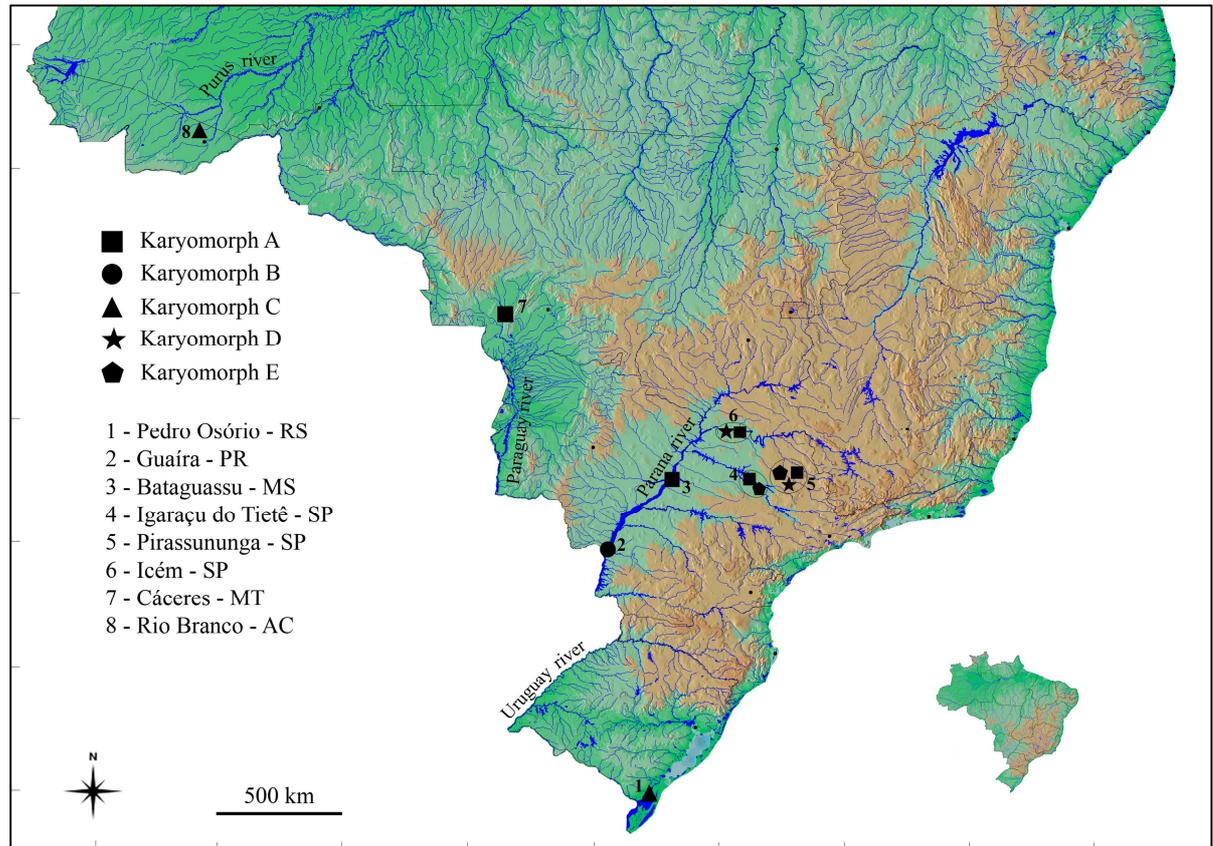


Figura 1. Mapa indicando locais de coleta das amostras de *S. marmoratus*. Os números indicam o ponto de coleta, enquanto os símbolos representam os cariomorfos encontrados em cada uma das localidades.

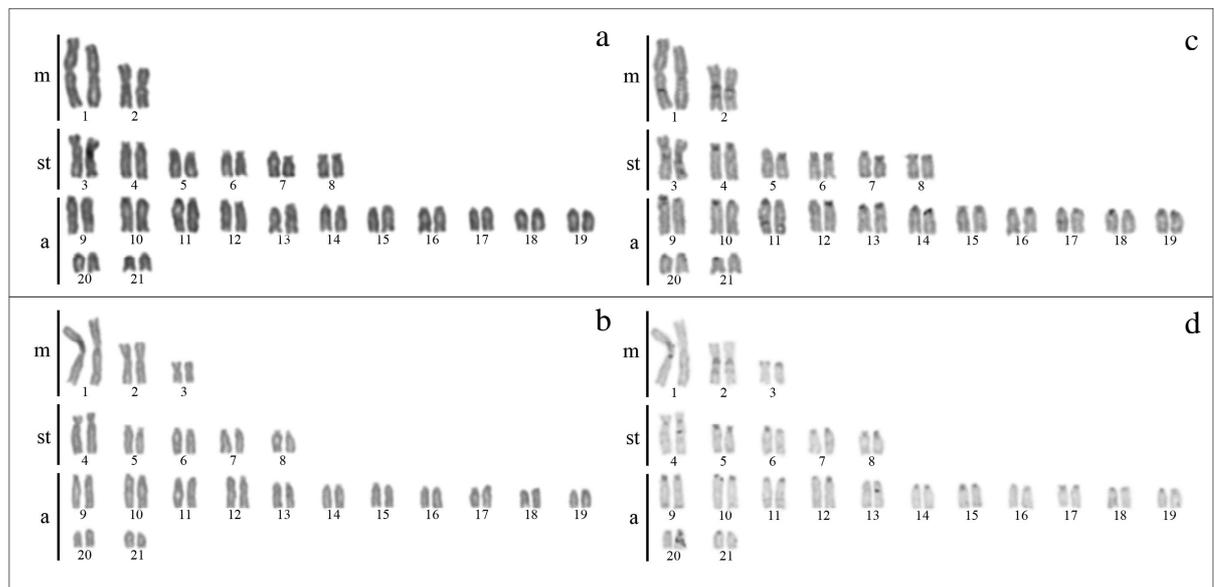


Figura 2. Cariótipos padrão de exemplares de *S. marmoratus* dos cariomorfos A e B após coloração convencional com Giemsa (a, b) e bandamento C (c, d).

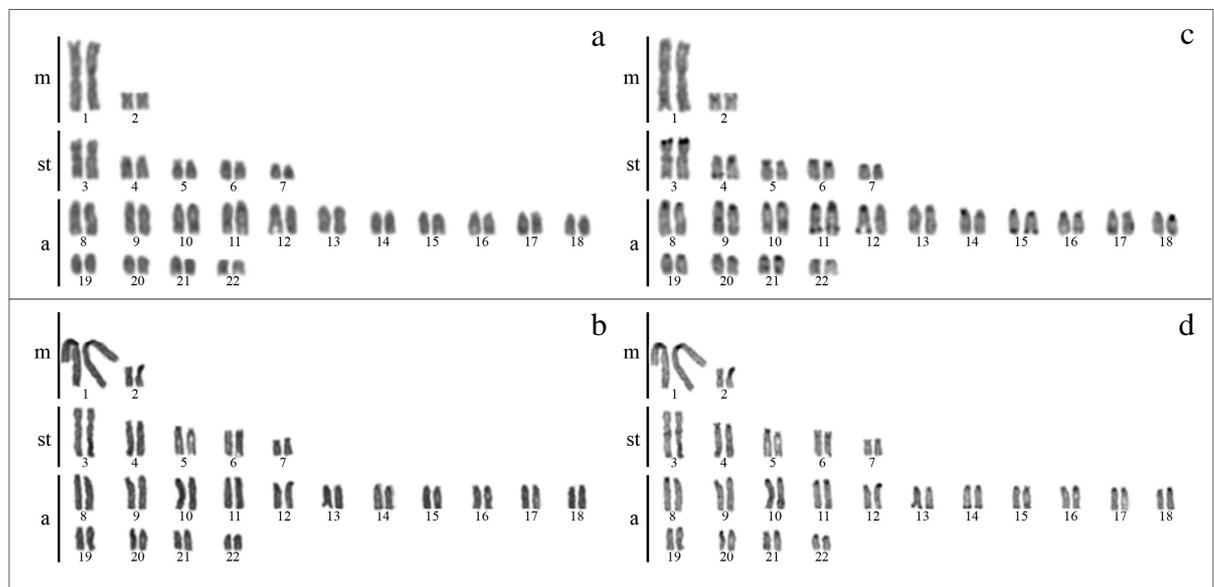


Figura 3. Cariótipos padrão de exemplares de *S. marmoratus* do cariomorfo C provenientes do Acre e Pedro Osório após coloração convencional com Giemsa (a, b) e bandamento C (c, d).

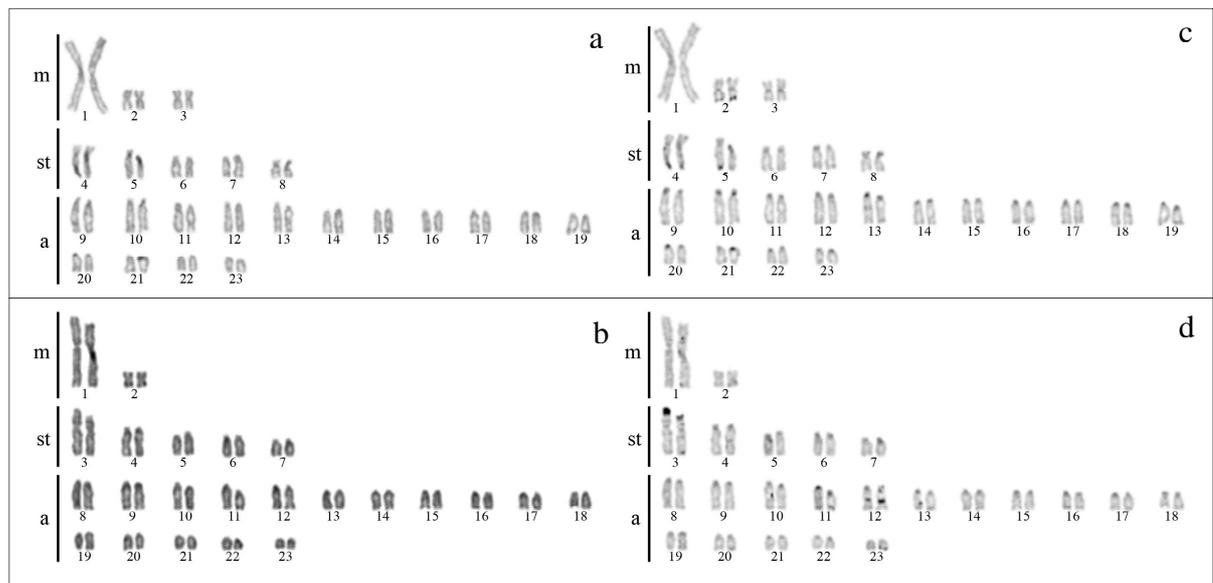


Figura 4. Cariótipos padrão de exemplares de *S. marmoratus* dos cariomorfos D e E após coloração convencional com Giemsa (a, b) e bandamento C (c, d).

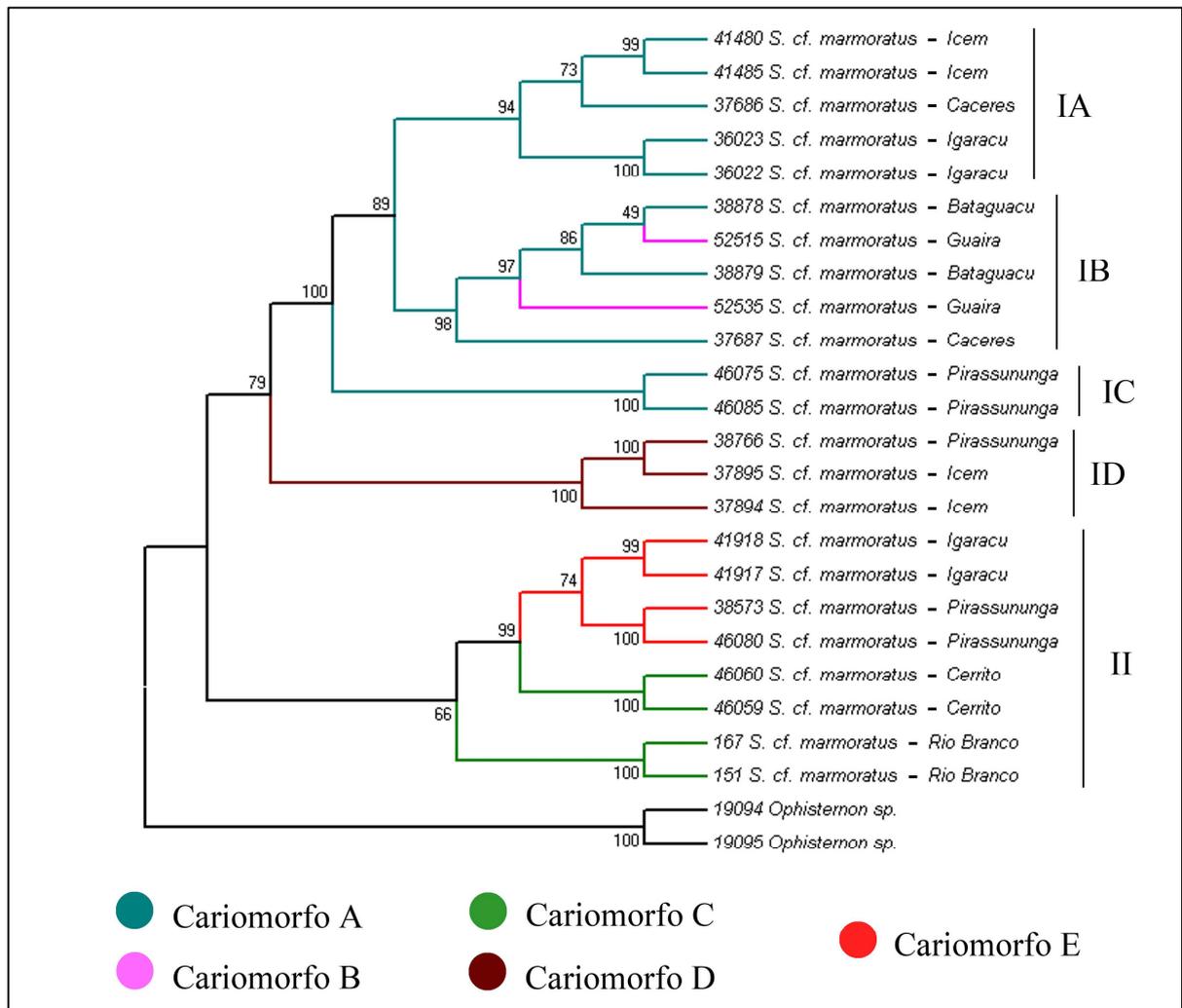


Figura 5. Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando 1000 pseudoreplicas. As cores representam cada um dos cariomorfos caracterizados e os grupos utilizados como referência estão ao lado direito.

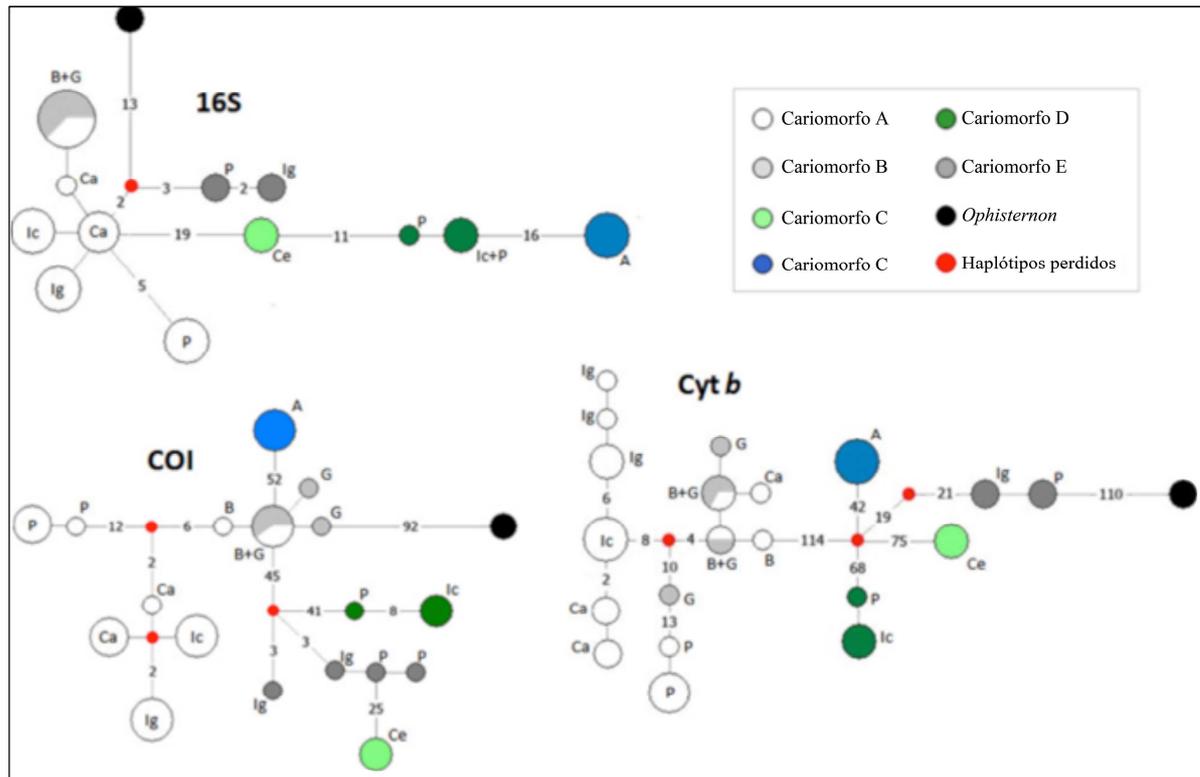


Figura 6. Rede de haplótipos de *S. marmoratus* elaborada a partir das sequências dos genes 16S COI e CytB. As divergências entre os haplótipos é definida pelos passos mutacionais entre cada um deles, sendo as linhas contínuas representantes de apenas uma mutação e as demais pelo número intercalando as conexões.

A - Acre, B - Bataguassu, Ca - Cáceres, Ce – Cerrito (Pedro Osório), G - Guaíra, Ic - Icém, Ig – Igarapu, P - Pirassununga.

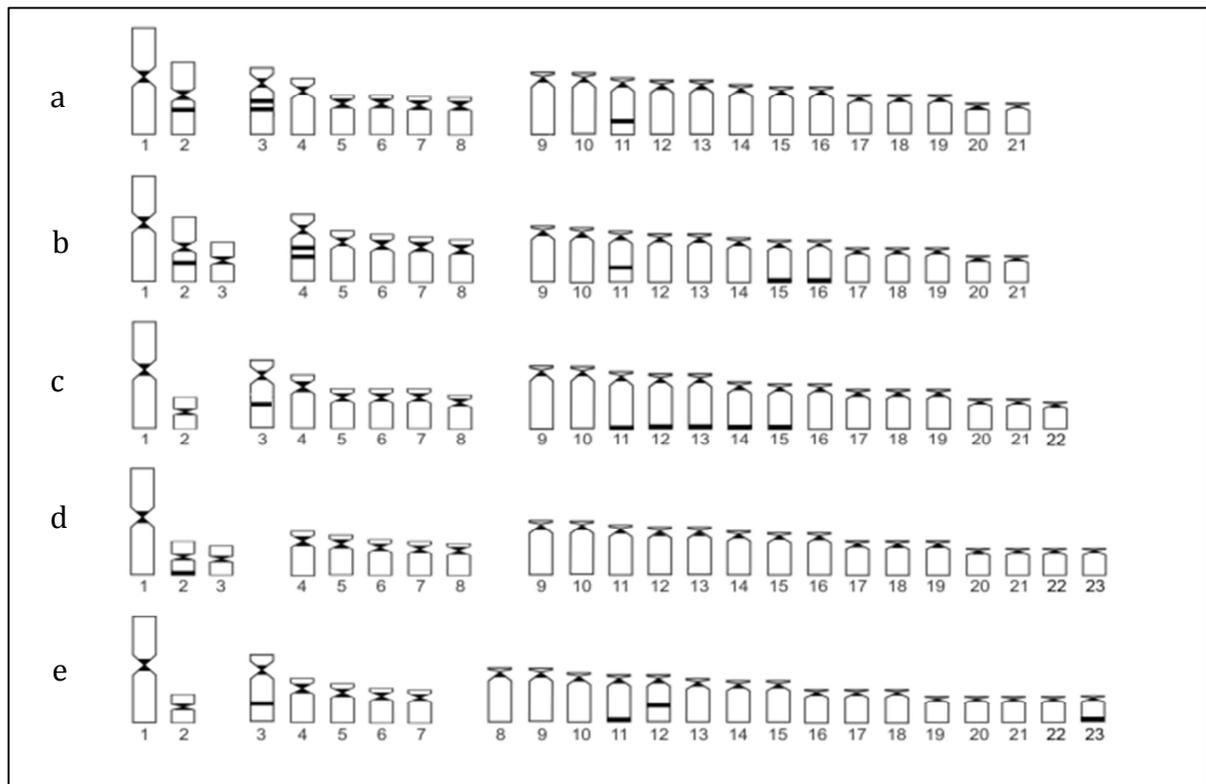


Figura 7. Ideogramas representativos de cada um dos cariomorfos analisados. As marcas nos cromossomos representam blocos heterocromáticos, evidenciados pelo bandamento-C. Em a, Cariomorfo A; em b, Cariomorfo B; em c, Cariomorfo C; em d, Cariomorfo D e em e, Cariomorfo E.

Capítulo 2

Mapeamento citogenético comparativo de sequências repetitivas em cariomorfos de *Synbranchus marmoratus*. Distintos modos de distribuição e organização nos genomas.

Resumo

A espécie de peixe *Synbranchus marmoratus* apresenta ampla distribuição geográfica, por toda a região Neotropical. Embora considerada uma única entidade taxonômica, os representantes desta espécie exibem significativa diferenciação cariotípica, tanto numérica quanto estrutural, o que permitiu, até o momento, a identificação de cinco grupos (cariomorfos) dentro desta espécie. No entanto, dados sobre a organização e localização de sequências de DNA repetitivo no genoma dos representantes destes grupos ainda são incipientes. Considerando a abundância destas sequências no genoma dos eucariotos e a sua importância para a compreensão dos mecanismos de evolução e diferenciação cariotípica, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar um mapeamento físico de distintas classes de DNA repetitivo no genoma dos cinco cariomorfos conhecidos para *S. marmoratus*. Os resultados obtidos demonstram que o DNAr 5S se mantém conservado em um mesmo par de cromossomos em todos os cariomorfos analisados. Por outro lado, sítios para o DNAr 18S foram observados em múltiplos e distintos cromossomos em todos os cariomorfos, evidenciando a ocorrência de extenso polimorfismo intrapopulacional. No entanto, experimentos de impregnação por nitrato de Prata mostram que as RONS ativas são simples e indicam a provável ocorrência de inativação dos sítios variantes. Os genes para a histona H3 foram localizados na forma de pequenos *clusters* amplamente espalhados pelo genoma, sugerindo um padrão de organização genômica próprio desta família multigênica em *Synbranchus*, distinto do observado em outros grupos de peixes. Da mesma forma, o elemento transponível *Rex3* também apresentou um modo de distribuição disperso no genoma. No entanto, um acúmulo considerável destes elementos foi notado na região do centrômero de um único par cromossômico do cariomorfo A, indicando um estágio diferenciado de estruturação genômica desta amostra. Os dados apresentados revelam que diferentes classes de DNA repetitivo estão organizadas de forma diferenciada nos genomas de *S. marmoratus*, além de evidenciar que estas sequências estão sob a ação de mecanismos distintos de controle da sua dispersão pelo genoma neste grupo de organismos.

Introdução

Os genomas de organismos eucariontes são caracterizados por apresentar uma grande quantidade de segmentos de DNA repetitivo. Tais sequências são conhecidas por apresentarem uma alta variabilidade em relação à sua composição nucleotídica, número de cópias, função e forma de distribuição e organização no genoma (Charlesworth *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 2003). De modo geral, estas sequências podem ser classificadas em codificantes, representadas pelas famílias multigênicas ribossômicas e histônicas, e não-codificantes, encontradas como sequências repetidas *in tandem* ou dispersas no genoma (Sumner, 2003; Nagoda *et al.*, 2005).

A natureza repetitiva destas sequências qualifica este material como ideal para a construção de sondas para uso em FISH, metodologia que permite determinar a localização destas sequências em cromossomos metafásicos. Estudos relativos à organização e mapeamento físico deste tipo de sequência têm permitido uma melhor caracterização da biodiversidade e da evolução da ictiofauna (Martins, 2007; Vicari *et al.*, 2010). Além disso, estes dados também possibilitaram um avanço no conhecimento sobre a organização, diversificação, evolução e os possíveis papéis que os DNAs repetitivos podem desempenhar no genoma de vertebrados (Haff *et al.*, 1993; Martins e Galetti, 1999; Gursel *et al.*, 2003). No entanto, a grande maioria dos estudos de mapeamento realizados em peixes Neotropicais é direcionada à localização de sítios ribossômicos, sendo escassas as informações sobre outros tipos de sequências como de genes para histonas e de elementos transponíveis (TEs) (Cioffi *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011a; Valente *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2011, 2012; Lima-Filho *et al.*, 2012).

Embora seja nominalmente conhecido como uma única entidade taxonômica, *S. marmoratus* (Synbranchiformes, Synbranchidae) apresenta uma diversidade citogenética considerável, com a ocorrência de distintas variantes cariotípicas (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sánchez e Fenocchio, 1996; Torres *et al.*, 2005; Capítulo I), resultando em cinco cariomorfos bem diferenciados e principais. Assim, todos os representantes dos cariomorfos A e B apresentam $2n=42$, sendo que, uma inversão pericêntrica em um cromossomo submetacêntrico do cariomorfo A estaria relacionada à origem do cariomorfo B. De forma oposta, hipóteses sobre os rearranjos cromossômicos não podem ser feitas de modo direto para explicar, com segurança, a origem dos cariomorfos C ($2n=44$), D e E ($2n=46$), uma vez que os eventos responsáveis pelo surgimento destes números diploides parecem ter por base eventos independentes e bidirecionais (Capítulo I). Nesse sentido, deve-se considerar que os números

diploides e as fórmulas cariotípicas não podem ser utilizados de forma indiscriminada para o entendimento das relações filogenéticas entre os cariomorfos de *S. marmoratus* (Capítulo I).

O presente trabalho reporta um estudo comparativo de amostras pertencentes aos cinco cariomorfos de *S. marmoratus* existentes, utilizando marcadores cromossômicos como a identificação das regiões organizadoras de nucléolo ativas (Ag-RONs) e localização de sítios de DNA repetitivo pertencentes a diferentes classes (DNAr 5S e 18S, DNAhis H3, TE *Rex3*), com o intuito de investigar os padrões de distribuição de cada elemento no genoma de representantes deste grupo e de buscar a determinação de homologias cromossômicas entre os cariomorfos, no sentido de verificar sua utilização na determinação das relações evolutivas entre os cariomorfos.

Material e métodos

Amostras analisadas

No presente trabalho foram analisados um total de 39 amostras de *S. marmoratus*, coletadas em ambiente natural de cinco localidades brasileiras (Figura 1, Tabela 1). Os exemplares foram identificados segundo Rosen e Greenwood (1976) e, após análise, fixados em formalina 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil, com os números de tombamento LBP 11355 (Bataguassu), LBP 11356 (Pedro Osório), LBP 11365 (Pirassununga), LBP 11362 (Icém) e LBP 11364 (Guaíra).

Análises citogenéticas

Preparações e Bandamentos cromossômicos

Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína e sacrificados para análise citogenética. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal com base no protocolo referido em Foresti *et al.* (1993). Para a detecção das RONS ativas foi utilizado o protocolo estabelecido por Howell e Black (1980).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Obtenção e marcação das sondas compostas por DNA repetitivo

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo o protocolo do produto. As sequências para DNAr 5S e 18S, DNA DNahis H3 e para o elemento transponível *Rex3* foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico de representantes de *S. marmoratus*, utilizando primers já descritos anteriormente (White *et al.*, 1990; Pendás *et al.*, 1994b; Colgan *et al.*, 1998; Volff *et al.*, 1999). As reações foram realizadas para um volume final de 25ul, utilizando 200uM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 1X de *Taq* DNA buffer (20mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50mM KCl); 0,5U de *Taq* polimerase (Life Technologies); 0,1uM de cada primer e 50ng de DNA genômico.

A marcação das sondas compostas por DNA repetitivo foi realizada através de reações posteriores de PCR incluindo o nucleotídeo modificado digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) para marcar o DNAr 18S e *Rex3* e biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) para marcar o DNAr 5S e DNahis H3.

Hibridação *in situ* Fluorescente

Para os experimentos de FISH os cromossomos foram tratados de acordo com procedimentos descritos por Pinkel *et al.* (1986), utilizando uma stringência de 77%. As sondas marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) tiveram seus sinais detectados utilizando avidina-FITC (Roche Applied Science) e as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) tiveram seus sinais detectados com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos metafásicos foram contracorados com DAPI e as imagens foram capturadas por meio de câmera digital (Olympus DP70) acoplada a um fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX61). A montagem dos cariótipos e a padronização de brilho e contraste foram realizados com uso do programa Adobe Photoshop CS4.

Análises moleculares

Considerando que estudos que envolvem o mapeamento físico de genes histônicos e de elementos transponíveis ainda são escassos em peixes, sequências nucleotídicas foram obtidas do DNA utilizado com sonda para DNahis H3 e para o elemento transponível *Rex3*, visando confirmar o conteúdo nucleotídico das sondas, bem como testar a qualidade dos primers descritos.

Os produtos de PCR foram purificados usando ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo as instruções dos protocolos do produto e usados para montar reações de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), submetido ao programa presente no manual do kit. Os produtos destas reações foram purificados e as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. As sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência consenso. As sequências consenso foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) disponível online no link <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>, submetidas ao programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) no dia 09/10/2012 para a busca de similaridades de sequências disponíveis neste banco de dados.

Resultados

Análises citogenéticas

As análises citogenéticas realizadas revelaram a existência de indivíduos pertencentes ao cariomorfo A, formado por indivíduos com $2n=42$ ($4m + 12st + 26a$); cariomorfo B, formado por indivíduos com $2n=42$ ($6m + 10st + 26a$); cariomorfo C, formado por indivíduos com $2n=44$ ($4m + 12st + 28a$); cariomorfo D, formado por indivíduos com $2n=46$ ($6m + 8st + 32a$) e cariomorfo E, formado por indivíduos com $2n=46$ ($6m + 8st + 32a$). A distribuição e localização de cada cariomorfo estão sumarizadas na Tabela 1.

A impregnação por nitrato de Prata revelou marcações em posição terminal do braço curto nos cromossomos do par 7 no cariomorfo A (Figura 2f), no braço curto do par 15 do cariomorfo B (Figura 2g), no braço longo do par 15 e em um dos homólogos do par 9 do cariomorfo C (Figura 2h), no braço longo do par 2 e em um dos homólogos do par 1 do cariomorfo D (Figura 2i) e no braço curto do par 3 do cariomorfo E (Figura 2j).

As hibridações utilizando as sondas de DNAr 5S revelaram marcações em um único par de cromossomos acrocêntricos que aparenta ser constante entre todos os cariomorfos analisados, sendo que as variações de posição encontradas parecem ocorrer devido à organização na montagem dos cariótipos. A FISH com sonda de DNAr 18S revelou padrões distintos entre os cariomorfos analisados. Para cada cariomorfo, duas marcações foram constantes em todos os indivíduos analisados, sendo no Cariomorfo A – par 7, Cariomorfo B – par 15, Cariomorfo C – par 15, Cariomorfo D – par 2 e Cariomorfo E – par 3 (Figuras 2a, b, c, d e e). No entanto, uma extensa variação de localização destes sítios entre indivíduos

pertencentes ao mesmo cariomorfo foi evidenciada, caracterizando a ocorrência de variação intrapopulacional (Destaque nas Figuras 2a, b, c e e).

Os sítios de DNAhis H3 foram detectados na forma de pequenos *clusters* dispersos em todos os cromossomos dos indivíduos analisados. Adicionalmente, alguns cromossomos apresentaram regiões com um pequeno acúmulo destas sequências, notadamente próximas às regiões teloméricas de cromossomos acrocêntricos (Figuras 3a, b, c, d e e). De forma semelhante, os elementos *Rex3* também se apresentam na forma de *clusters* dispersos no genoma. No entanto, nos indivíduos pertencentes ao cariomorfo A, um acúmulo acentuado destes elementos foi observado nos cromossomos do par 3, fato restrito a estas amostras (Figuras 4a, b, c, d e e).

Análises moleculares

As sequências nucleotídicas obtidas de DNAhis H3 (353 bp) e TE *Rex3* (420 bp) foram similares às sequências de outros organismos encontrados no banco de dados NCBI. O elemento transponível *Rex3* de *S. marmoratus* apresentou 70% de similaridade com o *Rex3* de *Xiphophorus maculatus*. As sequências do gene para histona H3 mostraram uma grande similaridade entre diferentes espécies, sendo de 96% o grau de semelhança na comparação da sequência de *S. marmoratus* com a de *Cratinus agassizii*.

Discussão

Variações relativas a números diploides e fórmulas cariotípicas são comuns e já foram descritas diversas vezes em *S. marmoratus* (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sanchez e Fenocchio, 1996; Torres *et al.*, 2005; Nirchio *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Capítulo I). Apesar disso, os cariomorfos analisados até o presente momento apresentam uma macroestrutura cariotípica homogênea, com a presença de poucos cromossomos dos tipos metacêntricos e subtelocêntricos e muitos acrocêntricos, característica que aparenta ser conservada nos dois gêneros representantes da família Synbranchidae da região Neotropical (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sanchez e Fenocchio, 1996; Torres *et al.*, 2005; Nirchio *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Capítulo I). No entanto, variações relativas às RONS já foram detectadas e indicam que rearranjos microestruturais ocorrem frequentemente e participam da diferenciação cariotípica destes peixes (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996; Sanchez e Fenocchio, 1996; Carvalho *et al.*, 2012).

Dentre os marcadores cromossômicos comumente utilizados no mapeamento físico dos cromossomos, as RONS estão entre as mais estudadas, uma vez que, além do uso de

impregnação por nitrato de Prata e marcação por Cromomicina A3 (Howell e Black, 1980; Gold e Amemiya, 1986), também podem ser reveladas através de sondas para DNAr 18S. Embora estas regiões sejam variáveis em relação à posição cromossômica em *S. marmoratus*, o número de sítios é conservado, sendo geralmente simples (Foresti *et al.*, 1992; Melillo *et al.*, 1996), com exceção de algumas amostras que apresentam RONS múltiplas (Sanchez e Fenocchio, 1996; presente trabalho). No entanto, considerando que foram obtidos por meio de impregnação por nitrato de Prata, estes resultados podem não corresponder verdadeiramente a todas as RONS existentes no genoma destas amostras (Gromicho *et al.*, 2005). No presente estudo, o uso das sondas de DNAr 18S confirmou os dados obtidos pela Prata em todos os indivíduos analisados; no entanto, também evidenciam sítios adicionais que se distribuem nos cromossomos de forma polimórfica e, aparentemente, aleatória intrapopulacionalmente nos cariomorfos A, B, C e E.

Polimorfismos intrapopulacionais de sequências ribossômicas já foram descritos em algumas espécies de peixes e aparentam estar relacionados com a posição telomérica destes sítios, o que facilitaria a transferência deste material durante a interfase (Foresti *et al.*, 1981; Mantovani *et al.*, 2005), ou devido à associação destas sequências com elementos transponíveis (Santi-Rampazzo *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2010). Além dos cariomorfos aqui relatados, em outra espécie do próprio gênero *Synbranchus* esta situação também já foi detectada (Carvalho *et al.*, 2012), sugerindo que esta característica seja comum também a este grupo. Neste sentido, poderia ser considerado que os mecanismos que atuam na extensa dispersão de DNAr 18S já estariam presentes antes da diversificação destas espécies ou cariomorfos. Além disso, tal polimorfismo intrapopulacional seria potencializado pela distribuição meiótica dos cromossomos, resultando no cenário atual de diversificação destes sítios. Adicionalmente, deve-se verificar que em todos os indivíduos analisados apenas um par de cromossomos portador de DNAr 18S é constante, contrastando com a ocorrência de diversas variantes aleatórias. Ainda, é possível verificar que as Ag-RONS são, em quase todos os casos, localizadas nestes cromossomos com DNAr 18S constante. Embora análises mais significativas sejam necessárias, pode ser hipotetizado que as cópias dispersas aleatoriamente teriam se degenerado e perdido sua função.

Martins e Wasko (2004) sugeriram que a posição intersticial do DNAr 5S é uma característica comum em muitos peixes e que este padrão não seria uma coincidência, uma vez que também é encontrado em muitos vertebrados (Schmid *et al.*, 1987; Mäkinen *et al.*, 1997). Dessa forma, estando nesta região cromossômica, a menor subunidade ribossomal estaria protegida de eventos como transferência de material genético, os quais são supostos agir na

dispersão do DNAr 18S que geralmente se localiza em posição telomérica (Martins e Wasko, 2004; Mantovani *et al.*, 2005). Nossos resultados estão de acordo com esta proposição e revelam que a localização do DNAr 5S é conservada em todos os cariomorfos de *S. marmoratus*, tanto em relação ao número de sítios, quanto à posição nos cariótipos das formas analisadas. Adicionalmente, corroboram resultados de análises em outras espécies deste grupo (Carvalho *et al.*, 2012) e indicam que, durante a história evolutiva deste gênero, esta família gênica se manteve inalterada em relação à sua posição cromossômica, estando presente em um único par de cromossomos acrocêntricos. Naturalmente, à medida que mais espécies e populações sejam estudadas, diversos exemplos que contradizem esta proposta podem ser encontrados (Cioffi *et al.*, 2009; Scacchetti *et al.*, 2012), principalmente se levarmos em conta o eminente papel desempenhado pelos elementos transponíveis na dispersão destes sítios, que atuam independente de sua posição cromossômica (Nakajima *et al.*, 2012). Ainda, deve-se notar que em algumas variantes dos cariomorfos C e E, o DNAr 18S está presente em sintonia com o DNAr 5S, o que gera dúvidas sobre a homologia dos cromossomos portadores dos sítios de DNAr 5S. No entanto, nossos dados nos permitem propor que esta situação esteja relacionada com a alta dinâmica do DNAr 18S em *S. marmoratus*.

Os genes histônicos constituem uma família multigênica complexa, podendo apresentar variações no número de cópias e no modo de organização no genoma. Embora dados sobre a localização cromossômica de sequências histônicas em peixes se restrinjam a poucas espécies (Pendás *et al.*, 1994a; Hashimoto *et al.*, 2011, 2012; Lima-Filho *et al.*, 2012), este tipo de marcador vem sendo utilizado com frequência em alguns invertebrados, revelando algumas características particulares como dispersão diferencial de sítios, localização em cromossomos B e associação com DNAr 5S (Drouin e Moniz de Sá, 1995; Eirín-Lopez *et al.*, 2004; Cabrero *et al.*, 2009). No presente estudo, nós mostramos que, nos cinco cariomorfos de *S. marmoratus* analisados, os genes para DNAr H3 estão distribuídos em todos os cromossomos na forma de pequenos *clusters* dispersos, podendo apresentar um acúmulo maior em alguns pares cromossômicos acrocêntricos.

Até o presente, sítios de histona H1 mapeados em peixes de distintas ordens, Characiformes (Hashimoto *et al.*, 2011), Siluriformes (Hashimoto *et al.*, 2012) e Perciformes (Lima-Filho *et al.*, 2012) se apresentam em grandes blocos cromossômicos, além disso, é suposto que alguma pressão seletiva atue na manutenção destas sequências em associação com sequências ribossômicas (Hashimoto *et al.*, 2011, 2012). O modo de organização e distribuição distintos de sítios DNAr H3 em *S. marmoratus* leva à proposição de que, neste grupo, estes sítios se organizam em pequenas e abundantes repetições pelo genoma. No

entanto, hipóteses adicionais para explicar a extensa distribuição destas sequências pelos cromossomos não podem ser ignoradas, podendo (i) ser atribuída à ocorrência de genes órfãos, derivados de famílias repetitivas *in tandem* em eucariotos, como já demonstrada acontecer em genes histônicos e ribossômicos (Childs *et al.*, 1981); (ii) à associação entre sequências histônicas e elementos transponíveis, devido à semelhança no padrão de distribuição de DNAs H3 com os elementos transponíveis (TEs) mapeados em peixes (Ferreira *et al.*, 2011a, 2011b), por fim, (iii) a possibilidade de genes histônicos organizados em *clusters* contendo todas as unidades de histona, exceto H1, também deve ser considerada. Esta situação já foi reportada em diferentes organismos e evidencia uma organização independente dos sítios DNAs H1 (Stephenson *et al.*, 1981; Cool *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1993; Albig *et al.*, 2003).

Considerando a numérica ictiofauna Neotropical, os TEs com distribuição mais conhecida são os retrotransposons do tipo non-LTR nomeados *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* (Gross *et al.*, 2009; Cioffi *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011a, 2011b; Valente *et al.*, 2011). Notavelmente, estes elementos tendem a se distribuir de maneira semelhante em grupos próximos e a sobreposição de sinais gerados por FISH entre TEs e outras sequências repetitivas levantam questões sobre o seu papel na dispersão de DNAs repetitivos (Mandrioli *et al.*, 2001; Mandrioli e Manicardi, 2001; Cioffi *et al.*, 2010). Em *S. marmoratus*, o elemento *Rex3* é encontrado na forma de pequenos *clusters* dispersos em todos os cariomorfos. Contudo, um acúmulo acentuado de repetições na região centromérica do par 3 foi encontrado nas amostras provenientes de Bataguassu (Cariomorfo A), dando indícios da ocorrência de um polimorfismo local, uma vez que, os indivíduos do cariomorfo B, que acredita-se ter derivado do cariomorfo A recentemente (Capítulo I), não possuem tal marcação neste mesmo cromossomo. Embora alguns estudos apontem para um possível papel dos TEs na manutenção e regulação da heterocromatina (Lippman *et al.*, 2004; Slotkin e Martienssen, 2007), em *S. marmoratus* este acúmulo parece estar mais relacionado a processos de amplificação, como permuta desigual (Elder e Turner, 1995), com posterior fixação destas sequências. Nesse sentido, a análise de maior número de indivíduos deste cariomorfo provenientes de outras localidades poderia colaborar na compreensão dos estágios iniciais da diversificação cariotípica neste grupo.

O mapeamento citogenético de diferentes tipos de DNA repetitivo em *S. marmoratus* revelou características notáveis e intrínsecas a cada um deles. No entanto, os resultados obtidos não foram úteis em auxiliar na determinação das relações entre os diferentes cariomorfos, como realizado em *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2009) e entre espécies do

gênero *Astyanax* (Hashimoto *et al.*, 2011). De fato, os DNAs repetitivos são caracterizados por serem altamente dinâmicos e, em alguns casos, esta intensa movimentação genômica pode gerar homoplasias e, conseqüentemente, se torna uma ferramenta ineficiente para traçar relações filogenéticas entre organismos. Além disso, fica evidente a falta de estudos relativos ao mapeamento físico e caracterização molecular de genes histônicos e TEs em peixes Neotropicais, o que poderia fornecer subsídios para um melhor entendimento sobre organização e evolução destas sequências nos genomas destes vertebrados.

Referências

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

Tabela 1: Localidades amostradas e os cariomorfos encontrados em cada uma delas. N: número de indivíduos analisados. P: ponto no mapa.

Localidade	Bacia	N	Cariomorfo	P	Coordenada
Pedro Osório	Lagoa Mirim	3	C	1	31°52'31" S – 52°48'58" O
Guaíra	Paraná	20	B	2	24°04'13" S – 54°12'08" O
Bataguassu	Paraná	3	A	3	21°38'49" S – 52°17'52" O
Icém	Grande	2	D	4	20°20'13" S - 49°07'56" O
Pirassununga	Mogi-Guaçu	5	E	5	21°55'41" S – 47°22'85" O

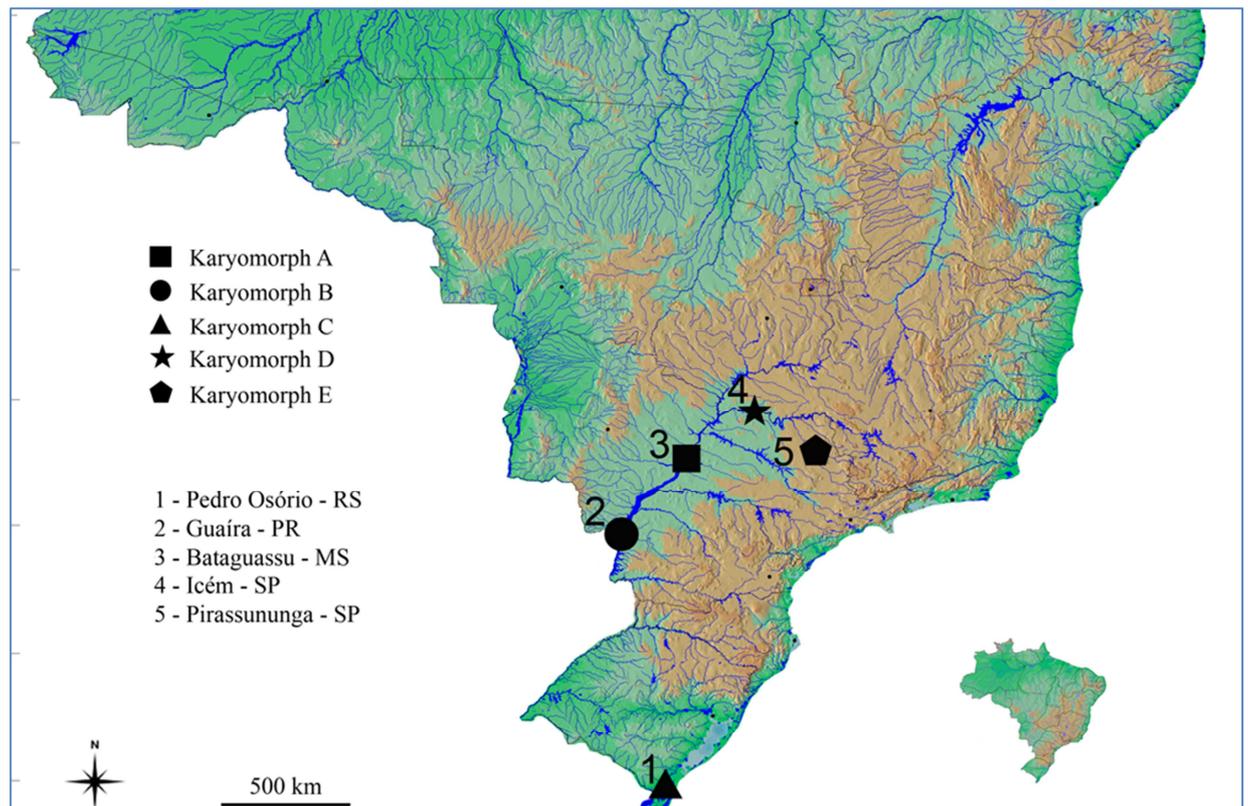


Figura 1. Mapa indicando locais de coleta das amostras de *S. marmoratus*. Os números indicam o ponto de coleta, enquanto os símbolos representam os cariomorfos encontrados em cada uma das localidades.

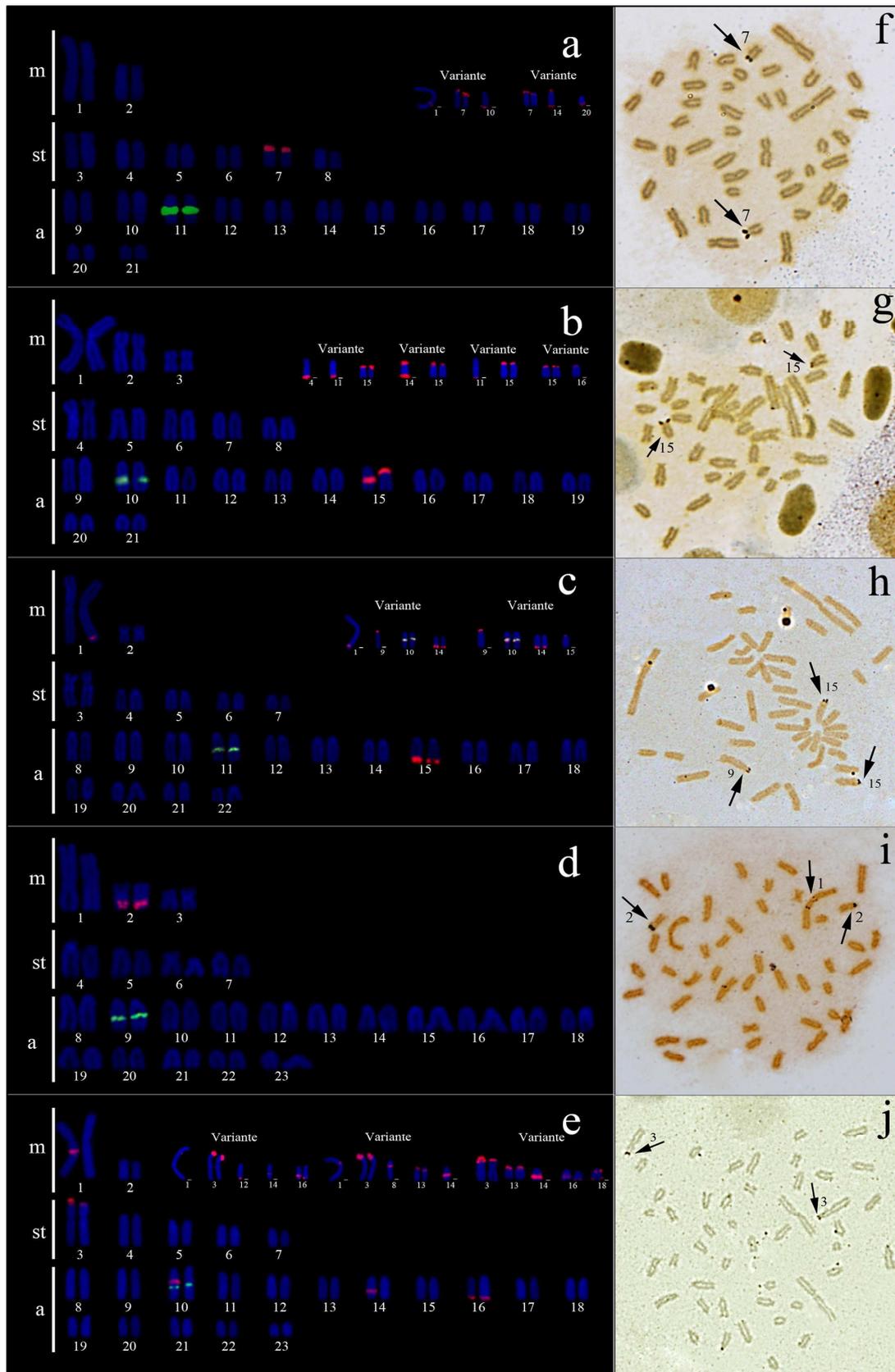


Figura 2. Cariótipos de exemplares de *S. marmoratus* após FISH com sondas de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) e metáfases após técnica de impregnação por nitrato de Prata dos cariomorfos A (a, f), B (b, g), C (c, h), D (d, i) e E (e, j). Em destaque nas pranchas, as variações interindividuais de localização de sítios de DNAr 18S observadas.

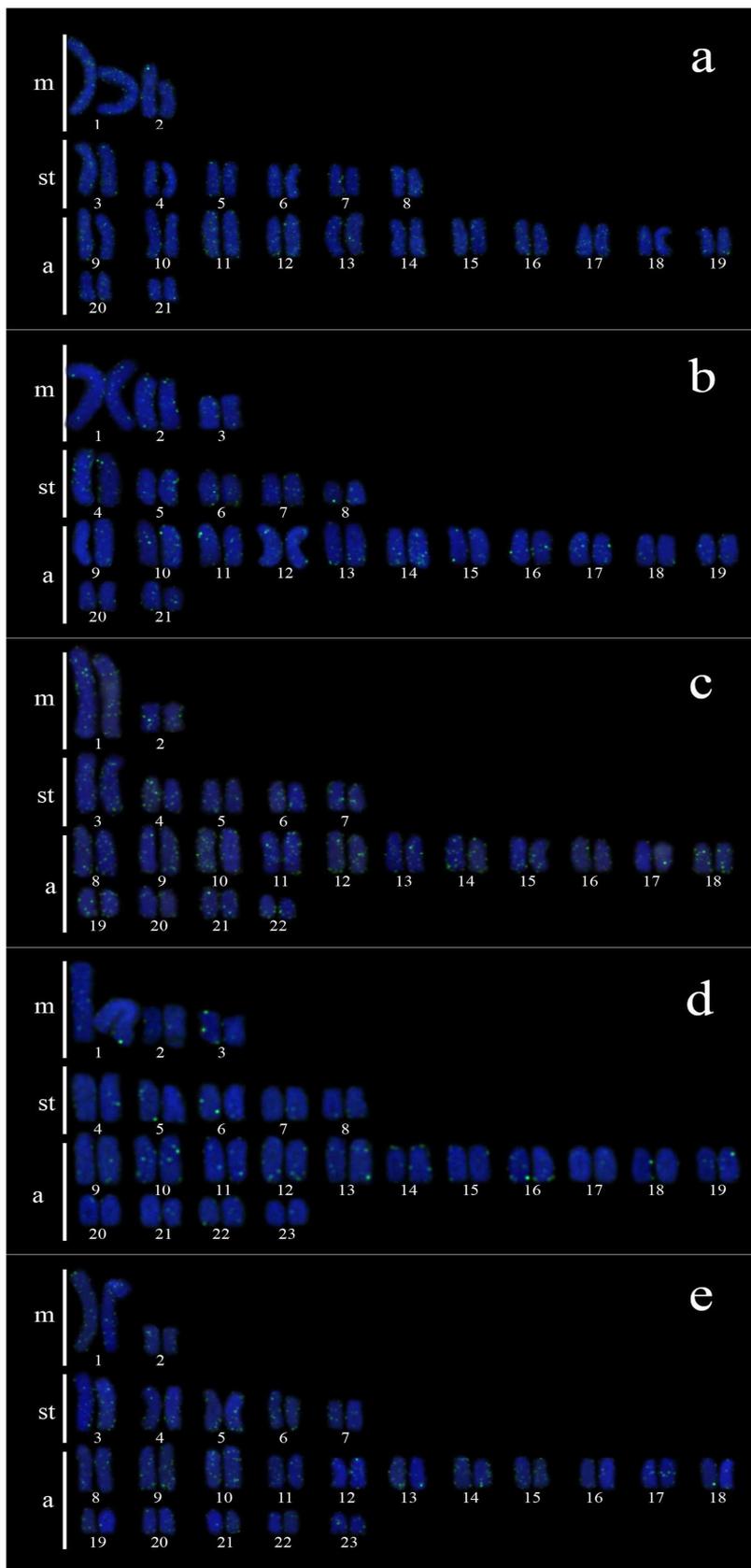


Figura 3. Cariótipos de exemplares de *S. marmoratus* pertencentes aos cariomorfos A (a), B (b), C (c), D (d) e E (e) após FISH utilizando sondas de DNAH3.

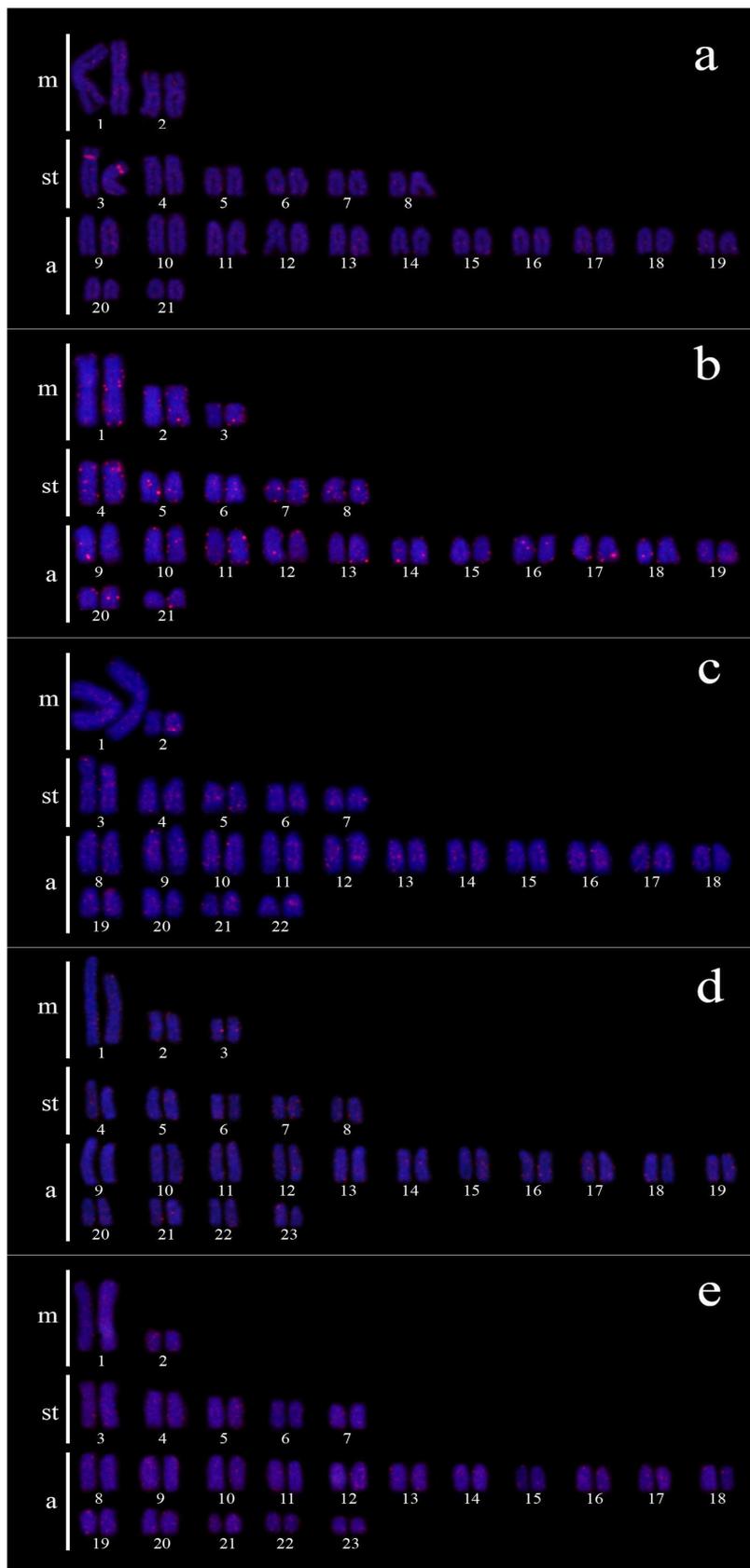


Figura 4. Cariótipos de exemplares de *S. marmoratus* pertencentes aos cariomorfos A (a), B (b), C (c), D (d) e E (e) após FISH utilizando sondas de *Rex3*.

5. Considerações Finais

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes amostras de *S. marmoratus* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cariotípica neste gênero. Como já constatado anteriormente, estes peixes constituem um complexo de espécies com a ocorrência de cariomorfos distintos e números diploides que variam entre $2n=42$, 44 e 46 cromossomos. A formação de populações isoladas e incapazes de realizar grandes migrações é característica em muitos grupos de peixes e as variações cariotípicas surgidas, geralmente são associadas ao processo de diferenciação alopátrica. Tendo em vista que a macroestrutura cariotípica destas amostras é semelhante, acredita-se que poucos do tipo Fusão ou Fissão possam ser responsáveis pelo surgimento das diversas variantes cariotípicas.

A análise nucleotídica de genes mitocondriais de indivíduos com cariótipos previamente conhecidos revela uma extensa variação entre as amostras e permite inferir a ausência de fluxo gênico entre os cariomorfos que ocorrem em simpatria. Nesse sentido, nós podemos concluir que os cariomorfos A, C, D e E são espécies distintas. No entanto, as amostras pertencentes ao cariomorfo B constituem um mesmo haplótipo em conjunto com uma das amostras pertencentes ao cariomorfo A (Bataguassu, MS), indicando que um rearranjo cromossômico seria uma etapa inicial da diferenciação biológica destes animais. Além disso, as análises realizadas permitiram uma melhor visão sobre a diferenciação cariotípica neste grupo. Estes resultados revelam a existência de dois grandes grupos, sendo que o primeiro engloba os indivíduos com $2n=42$ (Cariomorfos A e B) e $2n=46$ (Cariomorfo D), enquanto o segundo é composto pelos cariomorfos com $2n=44$ (Cariomorfo C) e $2n=46$ (Cariomorfo E). Além disso, as análises revelam que os eventos citogenéticos que determinam a evolução cariotípica neste grupo parecem não ter ocorrido de forma independente e não seguem um padrão linear no aumento ou redução do número diploide. Nesse contexto, embora não seja possível determinar o cariótipo ancestral em *S. marmoratus*, podemos concluir que informações contendo apenas os números diploides não devem ser utilizadas indiscriminadamente para determinar relações neste grupo.

Tendo em vista a grande quantidade de cromossomos acrocêntricos semelhantes em todos os cariomorfos analisados, a utilização dos cromossomos metacêntricos como marcadores se torna útil na compreensão de suas respectivas origens e evolução. No entanto, a evidência molecular que aponta para o surgimento independente de um pequeno cromossomo metacêntrico no cariomorfo B em relação aos demais que também o possuem (Cariomorfos C, D e E), gera dúvidas sobre a real homologia destes cromossomos e, assim

como os dados sobre números diploides das espécies, devem ser utilizados com cuidado em estudos evolutivos.

O mapeamento de sequências de genes ribossômicos em representantes dos cinco cariomorfos aqui descritos revela uma condição específica para cada um deles. Enquanto o DNAr 5S é extensamente conservado nestas amostras, ocorrendo em um único par acrocêntrico, o DNAr 18S varia entre os cariomorfos, apresentando, além disso, um intenso polimorfismo intrapopulacional com relação à posição destes sítios. Esta situação evidencia que os mecanismos genômicos que atuam sobre estes sítios são distintos. Nesse sentido, acredita-se que a posição cromossômica das sequências ribossômicas (intersticial em DNAr 5S e terminal em DNAr 18S) poderia ter influência sobre o seu processo de dispersão. No entanto, uma hipótese que não deve ser descartada é uma possível associação do DNAr 18S com elementos transponíveis, uma vez que sítios intersticiais destas sequências também podem ser observados em algumas variantes.

Em peixes Neotropicais, dados sobre a localização cromossômica de DNAhis e elementos transponíveis ainda são escassos e revelam características particulares destas sequências. Enquanto o DNAhis aparenta ser conservado em grupos próximos, em relação à posição nos cromossomos, os elementos transponíveis se mostram diversos, tanto na posição quanto na sua forma de organização no genoma. Em *Synbranchus*, ambas as sequências pertencentes a estas classes (DNAhis H3 e TE *Rex3*) estão distribuídas por todo o genoma na forma de pequenos *clusters* dispersos. A forma de distribuição de DNAhis H3 difere dos padrões obtidos em outros vertebrados e indica que esta sequência não está repetida em grandes blocos genômicos. Por outro lado, o TE *Rex3* se distribui pelo genoma de forma semelhante à encontrada em outros grupos de peixes, mostrando, além disso, um acúmulo acentuado em um cromossomo do cariomorfo A (Bataguassu-MS), em processo que aparenta ser um primeiro estágio de diferenciação cariotípica.

Os resultados apresentados sobre o mapeamento cromossômico de diferentes sequências repetitivas foram diferenciais entre si, mantendo, porém, restritas as informações de interesse para o entendimento da carioevolução deste grupo. As características da estrutura cromossômica observadas com o estudo do mapeamento de marcadores moleculares de sequência repetidas de DNA, contudo, permitem elaborar um panorama geral de distribuição e evolução destes sítios no genoma de *S. marmoratus*.

6 Referências Bibliográficas

- Albig W, Warthorst U, Drabent B, Prats E, Cornudella L, Doenecke D. 2003. *Mytilus edulis* core histone genes are organized in two clusters devoid of linker histone genes. *Journal of Molecular Evolution*, 56: 597 – 606.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. 2000. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chromosome Today*, 13: 169-182.
- Arkhipchuk VV. 1999. Database of Fish chromosomes. [Http://www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
- Amaro RCL, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 880–888.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28: 153-159.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603-613.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 148-155.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Diniz D, Moreira-Filho O. 2009. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20: 1–8.
- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O. 2010. Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations. *Neotropical Ichthyology*, 8: 361–368.
- Bremer K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295-303.

- Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JPM. 2009. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research*, 17: 397–404.
- Campbell BC, Steffen-Campbell JD, Werren JH. 1994. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 2: 225-237.
- Carvalho NDM, Gross MC, Schneider CH, Terencio ML, Zuanon J, Feldberg E. 2012. Cytogenetics of Synbranchiformes: a comparative analysis of two *Synbranchus* Bloch, 1795 species from the Amazon. *Genetica*, 140: 149-158.
- Chalesworth B, Snlegowski P, Stephan W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Childs G, Maxson R, Cohn RH, Kedes L. 1981. Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. *Cell*, 23:651–663.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. 2009. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics*, 10: 34-45
- Cioffi MB, Bertollo LAC. 2010. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, 105: 554-561.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10:271-280.
- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC. 2011. Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. *Genetica*, 139: 1065–1072.
- Clement M, Posada D, Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Cole CJ, Levans CR. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetology Review*, 3: 102.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF. 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, 46: 419-437.

- Cool D, Banfield D, Honda BM, Smith MJ. 1988. Histone genes in three sea star species: cluster arrangement, transcriptional polarity and analysis of the flanking regions of H3 and H4 genes. *Journal of Molecular Evolution*, 27: 36 – 44.
- Crossley SA. 1986. Courtship-sounds and behavior in the four species of the *Drosophila bipunctinata* complex. *Animal Behaviour*, 34: 1146-1159.
- Dobigny G, Aniskin V, Volobouev V. 2002. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two new cryptic species. *Cytogenetic and Genome Research*, 96: 117-124.
- Drouin G, Moniz de Sá M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeats of other multigene families. *Molecular Biology Evolution*, 12: 481-493.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Eirin-Lopez JM, González-Tizón AM, Martínez A, Méndez J. 2004. Birth-and-Death Evolution with Strong Purifying Selection in the Histone H1 Multigene Family and the Origin of orphan H1 Genes. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1992–2003.
- Elder JF, Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70: 297-320.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (Version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:47-50.
- Faria R, Navarro A. 2010. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 660-669.
- Favorito SE, Zanata AM, Assumpção MI. 2005. A new *Synbranchus* (Teleostei: Synbranchiformes: Synbranchidae) from ilha de Marajó, Pará, Brazil, with notes on its reproductive biology and larval development. *Neotropical Ichthyology*, 3: 319-328.
- Favorito–Amorim SA. 1998. Relações filogenéticas da ordem Synbranchiformes e revisão sistemática da família Synbranchidae. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 217 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with

- emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. Cytogenetic and Genome Research, 118: 78-83
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. 2011a. Elements *Rex1* and *Rex3* in three Fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Cytogenetic and Genome Research, 132: 64-70.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. 2011b. A new dispersed element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). Mobile Genetic Elements, 1: 103-106.
- Fong PP, Garthwaite RL. 1994. Allozyme electrophoretic analysis of the *Hediste limnicola* — *H. diversicolor* — *H. japonica* species complex (Polychaeta: Nereididae). Marine Biology, 118: 463-470.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions on fishes. Cytogenetic and Cell Genetics, 31: 137-144.
- Foresti F, Oliveira C, Tien OS. 1992. Cytogenetic studies of the genus *Synbranchus* (Pisces, Synbranchiformes, Synbranchidae). Naturalia, 17: 129 – 138
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. Experientia, 49: 810-813.
- Gilbert JJ, Walsh EJ. 2005. *Brachionus calyciflorus* is a Species Complex: Mating Behavior and Genetic Differentiation Among Four Geographically Isolated Strains. Hydrobiologia, 546: 257-265.
- Gold JR, Amemiya CT. 1986. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. Copeia, 1: 226-231.
- Green CA, Keogh H, Gordon DH, Pinto M, Hartwig EK. 1980. The distribution, identification, and naming of the *Mastomys natalensis* species complex in southern Africa (Rodentia: Muridae). Journal of Zoology, 192: 17–23.
- Gromicho M, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ. 2005. Lack of correspondence between CMA₃-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. Cytogenetic and Genome Research, 109: 507-511.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae): Chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. Cytogenetic and Genome Research, 127: 43 – 53.

- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C, Feldberg E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76:1117–1127.
- Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. 2003. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *The Journal of Immunology*, 171: 1393-1400.
- Haff T, Schmid M, Steinlein C, Galetti PM, Willard H. 1993. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1: 77-86.
- Haga T, Noda S. 1976. Cytogenetics of the *Scilla scilloides* complex. *Genetica*, 46: 161-176.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F. 2011. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cyogenetic and Genome Research*, 134: 64-71.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F. 2012. Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenetic and Genome Research*.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapte fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 14812-14817.
- Hoffman AA, Rieseberg LH. 2008. Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation?. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39: 21-42.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acid Research*, 19: 4780.
- Ji FY, Yu QX, Li K, Ren XH. 2003. Ag-staining pattern, FISH and ISH with rDNA probes in the rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew) chromosomes. *Hereditas*, 138: 207-212.
- Kazan K, Manners JM, Camero DF. 1993. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 36: 43 – 49.

- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111 – 120.
- Kirkpatrick M, Barton N. 2006. Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*, 173: 419-434.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 6196-6200.
- Kozak KH, Blaine RA, Larson A. 2006. Gene lineages and eastern North American palaeodrainage basins: phylogeography and speciation in salamanders of the *Eurycea bislineata* species complex. *Molecular Ecology*, 15: 191–207.
- Landry C, Geyer LB, Arakak Y, Uehara T, Palumbi SR. 2003. Recent speciation in the indowest Pacific: Rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *Proceeding of the Royal Society*. 270: 1839–1847.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lima-Filho PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF. 2012. Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 434: 63-70.
- Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD. 2004. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430: 471-475
- Liu JD, Yi MS, Zhao G, Zhou F, Wang DQ, Yu QX. 2002. Sex chromosomes in the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*) revealed by mitotic and meiotic analysis. *Cytogenetic and Genome Research*, 98: 291-297.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba MCSL, Wesselingh. 1998. The stage of Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, pp. 13–48
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. 1998. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology*, 21: 201-206

- Mäkinen A, Zijlstra C, De Haan NA, Mellink CHM, Bosma AA. 1997. Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 78: 231–235.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Machella N, Caputo V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica*, 110: 73-78.
- Mandrioli M, Manicardi GC. 2001. Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, 111: 433-438.
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123: 211-216
- Martins C, Galetti Jr. PM. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins C, Wasko AP. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 335-363.
- Martins C. 2007. Chromosomes and repetitive DNA: a contribution to the knowledge of the fish genome. In Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kappor BG. *Fish cytogenetics*. Science Publisher, Enfield, 421–453.
- Melilo IFM, Foresti F, Oliveira C. 1996. Additional cytogenetic studies on local populations of *Synbranchus marmoratus* (Pisces, Synbranchiformes, Synbranchidae). *Naturalia*, 21: 201 – 208.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, Souza ACP, Carvalho Jr. JR, Nagamachi CY. 2008. Chromosomal evidence for a cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Evolutionary Biology*, 9: 75.
- Miller DJ, Harrison PL, Mahony TJ, McMillian JP, Miles A, Odorico DM, ten Lohuis MR. 1993. Nucleotide sequence of the histone gene cluster in the coral *Acropora formosa* (Cnidaria; Scleractinia): features of histone gene structure and organization are common to diploblastic and triploblastic metazoans. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 245 – 253.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 121–138.

- Miyatake T, Shimizu T. 1999. Genetic correlations between life-history and behavioral traits can cause reproductive isolation. *Evolution*, 53: 201-208.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14, 331–357.
- Moysés CB, Daniel-Silva MF, Lopes CE, Almeida-Toledo LF. 2010. Cytotype-specific ISSR profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes), 138: 179-189.
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y. 2005. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Molecular Biology*, 14: 713-717.
- Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C. 2012. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 198.
- Nakamoto W, Machado PEA, Foresti F. 1986. Hemoglobins patterns in different populations of *Synbranchus marmoratus* (Pisces, Synbranchidae). *Comparative Biochemical and Physiology*, 84: 377 – 382.
- Nakayama C, Jégu M, Porto JIR, Feldberg E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia*, 3: 866-869.
- Nirchio M, Mariguela TC, Ferreira IA, Foresti F, Oliveira C. 2011. Karyotype and nucleolus organizer regions of *Ophisternon aenigmaticum* (Teleostei: Synbranchiformes: Synbranchidae) from Venezuela. *Interciencia* 3: 229–233.
- Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 12084-12088.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. 1988a. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética*, 11: 577-624.
- Oliveira C, Torres RA, Favorito-Amorim S, Foresti F. 1997. Cytogenetic studies of *Mastecembelus armatus* (Pisces, Mastacembelidae). *Cytobios*, 92: 83-89.
- Oliveira C, Wright JM. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205- 11.

- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. 2007. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Fish Cytogenetics. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Enfield, Science Publisher, 111-164.
- Orr HA. 1995. The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics*, 139: 1805-1813.
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E. 1994a. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*, 103: 147–152.
- Pendás AM, Morán P, Freije JP, García-Vázquez E. 1994b. Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics Cell Genetics*, 67: 31-36.
- Perdices A, Doadrio I, Bermingham E. 2005. Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 460–473.
- Peres WAM, Buckup PA, Kantek DLZ, Bertollo LAC, Moreira-Filho, O. 2009. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. *Genetica*, 137: 305–311.
- Phillips RB, Reed KM. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Presgraves DC, Balagopalan L, Abmayr SM, Orr HA. 2003. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. *Nature*, 423: 715-719.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. 2003. Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742p.
- Ribeiro AC. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4: 225-246.
- Rieseberg LH. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 351–358.

- Rosen DE, Rumney A. 1972. Evidence of second species of *Synbranchus* (Pisces, Teleostei) in South America. *American Museum Novitates*.
- Rosen DE, Greenwood PH. 1976. A fourth Neotropical species of Synbranchid eel and the phylogeny and systematics of Synbranchiform. *Ann Wien von Mus Naturg* 157:1–70
- Ruiz A, Wasserman M. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, 70: 582-596.
- Sanchez S, Fenocchio AS. 1996. Karyotypic analysis in three populations of the South-American eel like fish *Synbranchus marmoratus*. *Caryologia*, 49: 65-71.
- Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PB, Ferreira PEB, Martins-Santos IC. 2008 Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer region in *Serrapinnus notamelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. *Journal of Fish Biology*, 72:1236-1243.
- Santos U, Völcker CM, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva SR, Dergam JA. 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, 75: 2326–2343.
- Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Claro FL, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Foresti F. 2012. Molecular Characterization and Physical Mapping of Two Classes of 5S rDNA in the Genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 136: 131–137.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. 2010. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421–438.
- Schmid M, Vitelli L, Batistoni R. 1987. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma* 95: 271-284.
- Slotkin RK, Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8: 272-285.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web Servers. *Systematic Biology*, 57: 758-771.
- Stephenson E, Erba H, Gall J. 1981. Characterization of a cloned histone gene cluster of the newt *Notophthalmus viridescens*. *Nucleic Acid Research*, 9: 2281 – 2295.
- Steven GN, Subramanyam R. 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources*, 9: 172–180.

- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner AT. 2003. *Chromosomes: organization and function*. London: Blackwell Publishing company.
- Swofford DL. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods). Ver. 4.0b10. Sinauer Associates.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistics analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. 2008. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1284-1291.
- Torres RA, Roper JJ, Foresti F, Oliveira C. 2005. Surprising genomic diversity in the Neotropical Fish *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae): how many species?. *Neotropical Ichthyology*, 3: 277-284.
- Tricett AJ, Butlin RK. 1994. Recombination suppressors and the evolution of new species. *Heredity*, 73: 339-345.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C. 2010. Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 34-42.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76: 1094–1116.
- Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- Wagner RP, Maguire MP, Stallings RL. 1993. *Chromosomes: a synthesis*. Wiley-Liss, Inc., New York.

- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360: 1847–1857.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 315-322.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 1-7.