

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/08/2018.

Viviani França de Sene

**Mapa cromossômico e análise citogenética molecular de espécies e populações de peixes
da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê
e Paranapanema**

Doutorado

Botucatu

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Mapa cromossômico e análise citogenética molecular de espécies e populações de peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema

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

Viviani França de Sene

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato-Alves

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sene, Viviani França de

Mapa cromossômico e análise citogenética molecular das espécies e populações de peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema / Viviani França de Sene. - Botucatu, 2016

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

1. Peixe - Genética. 2. Ácido ribonucleico. 3. Marcadores genéticos. 4. Genômica. 5. Transcriptoma.

Palavras-chave: Estruturação genômica ; Heptapteridae; Marcadores cromossômicos ; RNA; Transcriptoma .

Eu não estou longe,
apenas estou
do outro lado do Caminho...

Dedico ao meu especial e imortal avô

Mayael (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Com carinho e gratidão quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos, a todos que passaram pelo meu caminho para chegar até aqui e realizar mais um grande sonho. Nunca estamos sós, é verdade, me sinto privilegiada em saber que tenho amigos a quem posso confiar, pessoas que me apoiam e me acolhem sempre com tanto carinho. Ao longo dessa caminhada sou grata a Deus por ter convivido e conhecido tantas pessoas boas, de coração aberto e firme.

Quero agradecer a todos pelo aprendizado, em especial ao meu orientador **Dr. Fausto Foresti**, que além de transmitir seus conhecimentos e suas experiências, sempre esteve ao meu lado, pessoa venerada por sua sabedoria, amigo, sempre abrindo portas e apontando os caminhos.

À minha linda e especial família sempre presente, unida, pessoas as quais eu admiro muito, realmente especiais, trocando gestos de amizade e consideração, me ensinando a cada dia o que é amor.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que tanto me auxiliaram durante o trabalho e por todos os momentos compartilhados, pelos gestos de carinho, atenção, pessoas especiais em sua forma de ser e como são sempre bem vindas as suas ações.

Um agradecimento especial à **Priscilla Cardim Scacchetti**, pelo auxílio e apoio que foram de extrema importância para a finalização desta tese. Amizade e carinho!

Aos amigos que ao longo dessa caminhada tive a oportunidade de conhecer em Botucatu, SP e guardar para sempre dentro do meu coração; são inúmeras, pessoas com as quais dividi casa, dores e muitas alegrias que não passaram por acaso e deixaram muito aprendizado em minha vida, iluminaram de diversas formas o meu caminho. Amigos aos quais levarei para

sempre, como grãos de areia que compõe imensas dunas, gestos de compreensão, ternura e respeito, partes de um amor maior.

Em especial ao **Adauto Cardoso**, tenho sempre um lugar especial guardado para ti, em minha vida sua presença me ilumina com tanta luz e energia que quase não posso acreditar no fato de que tenho um amigo tão especial. Gratidão!

Aos amigos de longa jornada “A gente não faz amigos, reconhece-os” (Vinícius de Moraes).

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) por toda estrutura que tive ao longo desses anos de Pós-graduação; às agências de fomentos FAPESP, CAPES e CNPQ.

E ainda, mesmo que a palavra “obrigada” signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto tantas pessoas são importantes para mim e passaram pela minha vida fazendo grande diferença, tornando-a ainda mais especial.

Obrigada!

Resumo

Os estudos em citogenética de peixes Neotropicais têm se expandido de modo considerável nos últimos anos, principalmente devido à incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados cariomórficos. O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos de Citogenética e Genética Molecular de Peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu). Foram analisadas citogeneticamente, com relação aos aspectos estrutural e molecular cinco espécies de peixes da ordem dos Siluriformes, tendo como foco especial as espécies mais representativas da família Heptapteridae, sendo *Rhamdia quelen*, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus* e *Imparfinis mirin* encontrados nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema, no Estado de São Paulo, além de espécimes de *Pimelodella elongata*, provenientes do Rio Dos Bocas (03°16'07.6"S 079°44'14.8"W) Province El Oro, Equador. As análises de citogenética clássica envolveram a aplicação das técnicas de coloração por Giemsa para a caracterização do número diploide das espécies, que mostrou variação entre $2n=46$ a $2n=58$ cromossomos e o bandamento C para a localização de regiões heterocromáticas, além de técnicas de citogenética molecular com produção de sondas e mapeamento dos genes de DNAr 5S e 18S e mapeamento físico de 4 sequências de microsatélites ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀). Além disso, foi realizado a extração de RNA de pele em espécies de *Rhamdia* e *Pimelodella* para análise de seu transcriptoma. A integralização de abordagens em nível estrutural e molecular no estudo dos cromossomos permitiu a compreensão de questões relacionadas à biologia evolutiva dos componentes da família Heptapteridae e, por conseguinte, dos mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e de especiação dos peixes Neotropicais.

Abstract

Studies on cytogenetics of the Neotropical fishes have expanded considerably in recent years, mainly due to the incorporation of new techniques for collecting and interpreting karyomorphic data. This study forms part of the general program of Cytogenetics and Genetics studies Neotropical Fish Molecular being developed in the Laboratory of Biology and Genetics Fish (IBB / UNESP / Botucatu). Species and fish populations of the order of Siluriformes were cytogenetically analyzed with respect to structural and molecular aspects, with the special focus on the most representative species of Heptapteridae family, *Rhamdia quelen*, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus* and *Imparfinis mirini* found in components of river basins of the Grande, Tiete and Paranapanema rivers, in the State of São Paulo, as well as specimens of *Pimelodella elongata*, were collected at Dos Bocas (03°16'07.6"S 079°44'14.8"W) in the Province El Oro, Ecuador. The karyomorph analyzes involved the results obtained by using Giemsa staining techniques for the characterization of the diploid number of the species, which showed variation between $2n=46$ to $2n=58$ chromosomes, C-banding and chromosome location for the heterochromatic regions, as well as techniques of molecular cytogenetics in the production of probes and mapping of 5S rDNA and 18S genes and physical mapping of microsatellite sequences 4 ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀). and extraction of RNA of the species *Rhamdia* and *Pimelodella* for analysis of their transcriptome. The approach involving structural and molecular levels in the study of chromosomes allowed the understanding of questions related to evolutionary biology of the Heptapteridae family components and therefore the mechanisms involved in the processes of differentiation and speciation of Neotropical fish.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Considerações sobre a citogenética: Avanços técnicos em peixes	1
1.2	Citogenética Molecular: construção de mapas genéticos	2
1.3	DNAs repetitivos: seu papel na organização do genoma.....	5
1.4	Considerações sobre a ordem Siluriformes e a família Heptapteridae	8
1.5	Análise dos padrões de coloração em Peixe: Transcriptoma como ferramenta..	11
2	Objetivos.....	14
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Materiais	15
3.1.1	Espécies estudadas e locais de coleta	15
3.2	Métodos	18
3.2.1	Obtenção de células mitóticas.....	18
3.2.2	Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos.....	19
3.2.3	Coloração convencional com Giemsa.....	20
3.2.4	Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NOR).....	21
3.2.5	Deteção da heterocromatina constitutiva (banda C)	21
3.3	Métodos Moleculares	22
3.3.1	Extração de DNA genômico	22
3.3.2	Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente in situ (FISH)....	22

3.3.2.1 Preparação das sondas de DNA 5S e 18S	22
3.3.2.2 Preparação das sondas de microssatélites (GA) ₁₅ , (GC) ₁₅ , (TTA) ₁₀ e (CA) ₁₅	24
3.3.2.3 Hibridação in situ fluorescente (FISH)	24
3.4 Montagem dos cariótipos	26
3.3.3 Estudos transcriptoma	27
3.3.3.1 Extração de RNA	27
3.3.3.2 Preparação da biblioteca e sequenciamento Illumina	27
3.3.3.3 Análise de sequências, montagem dos contigs e detecção de SNPs	28
4 Resultados e Discussão	29
 4.1 Capítulo 1: Mapeamento cromossômico de microssatélites e DNAr 5S e 18S em espécies de Heptapteride (Teleostei: Siluriformes): acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica.	30
 4.2 Capítulo 2: Análise do transcriptoma de células de pele de <i>Pimelodella avanhandavae</i> e <i>Rhamdia quelen</i> (Teleostei: Heptapteridae): busca por genes de coloração.	50
 5 Considerações finais	76
 6 Referência Bibliográficas	78

1 Introdução

1.1 Considerações sobre a citogenética: avanços técnicos em peixes

A citogenética vem contribuindo de modo efetivo não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura dos cromossomos dos vertebrados devido ao seu grande avanço nos últimos anos, principalmente à utilização de novas técnicas. Hoje esses avanços técnicos têm se refletido nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas. Na região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem à superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira et al., 2007). Este levantamento aponta ainda que a ocorrência de cromossomos supranumerários foi descrita em 38 espécies e que a presença de cromossomos sexuais foi identificada em 62 espécies, sendo que 40 delas apresentaram heterogametia feminina e 22 mostraram heterogametia masculina. Estes resultados mostram um aumento substancial das informações cariotípicas em peixes, se comparados ao levantamento realizado por Oliveira et al. (1988a). Contudo os dados são ainda incipientes, se considerarmos que podem existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nessa região biogeográfica (Reis et al., 2003).

A crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico a partir de 1970, notadamente as de bandas C, as bandas obtidas por tratamentos com endonucleases de restrição e o emprego de fluorocromos base específicos como a Cromomicina A3 e o DAPI, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também uma melhor compreensão da estrutura dos cromossomos dos peixes e o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo et al., 2000b). Mais recentemente, o desenvolvimento de sondas específicas como aquelas para genes ribossomais

e de histonas, constituídas por sequências de DNA de moderada repetitividade, as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) como aquelas para os sítios de retrotransposons Rex 1 e Rex 3 e o advento da utilização da técnica de microdissecção cromossômica, método que possibilita o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida do genoma, tem possibilitado a identificação e hibridização de segmentos específicos de DNA em cromossomos metafásicos, através da técnica denominada FISH (Fluorescent in situ hybridization). Esse tipo de abordagem citogenética em nível molecular permite, ao se estudar porções diferenciais da cromatina nos cromossomos, obter informações mais precisas acerca da presença de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos, determinar a origem de cromossomos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas entre as espécies, além das técnicas revelarem características mais detalhadas sobre o genoma pela presença de bandas longitudinais nos cromossomos, composição de heterocromatina, particularidades estruturais e funcionais das regiões organizadoras de nucléolos, entre outras (revisão em Sumner 1972, 1990; Phillips e Reed, 1996; Henning, 2007, Sene et al., 2015).

O estudo citogenético contínuo e sistemático de determinados grupos de peixes tem levado ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica quanto dos processos evolutivos que envolvem o cariótipo dos peixes, que ocorrem em grande diversidade na região Neotropical.

1.2 Citogenética Molecular: construção de mapas genéticos

Marcadores citogenéticos e genéticos de DNA têm sido desenvolvidos para o mapeamento de segmentos cromossômicos e revelação da sua estrutura e atividade gênica, mas também têm sido empregados com grande sucesso na aquicultura, com o objetivo de

identificar espécies e populações, bem como de melhorar traços importantes nos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. Diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a construção de mapas genéticos, que podem oferecer benefícios particulares para a aquicultura, especialmente para a identificação de estoques, análises de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações (Hashimoto et al., 2010). A construção dos mapas genéticos é de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, fitogeográficos e evolutivos, entre outros.

Os mapas genéticos podem ser construídos atualmente de três maneiras: (1) pelo mapeamento físico, que localiza segmentos de DNA nos cromossomos e nos cariótipos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) por métodos que envolvem o estabelecimento de mapas genéticos de ligação, destinados a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos com base na frequência de recombinação entre os locos gênicos e, (3) com base no sequenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins et al., 2004). Em ciclídeos, que representam um grupo de peixes bastante estudado atualmente, a construção de bibliotecas genômicas para o mapeamento genético das espécies está voltada para as espécies africanas como *Oreochromis niloticus* (Katagiri et al., 2001) e *Haplochromis chilotes* (Watanabe et al., 2003). Além disto, já existe um mapa genético de ligação descrito na literatura construído a partir de sequências microssatélites e AFLPs (Anonymous Fragment Length Polymorphisms) (Kocher et al., 1998), bem como o primeiro mapa físico que reúne todos os tipos de sequências repetitivas já mapeadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Martins et al., 2004).

A microdissecção cromossômica é um método confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região do genoma citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo a elaboração de sondas para FISH,

construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e o mapeamento físico dos cromossomos para análise citogenética. A técnica de microdissecção foi introduzida inicialmente em citogenética humana (Bates et al., 1986), com a construção de uma biblioteca do cromossomo 2 usando-se fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke et al. (1989) elaboraram um procedimento de microdissecção no qual foi utilizada a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificar as pequenas quantidades de DNA dos fragmentos cromossômicos dissecados, sendo que este método foi aperfeiçoado por Senger et al. (1990) que dissecaram com sucesso bandas específicas de cromossomos bandeados com a técnica GTG. No início da década de 90, Meltzer et al. (1992) e Deng et al. (1992) desenvolveram a técnica de micro-FISH, na qual a microdissecção cromossômica é seguida pela amplificação do material dissecado via PCR, utilizando-se um primer degenerado (DOP – Degenerated Oligonucleotide Primer), sendo, então o produto desses PCR utilizado como sonda para FISH.

A técnica de micro-FISH permite a localização cromossômica de sequências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros (Trask, 1991). Em humanos, quando aliada às metodologias de citogenética clássica, esta técnica tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica na caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer et al., 1997; Wiltshire et al., 2001; Nuntakarn et al., 2002; Hu et al., 2004; entre outros). No contexto da evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada também na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Taguchi et al., 2003; Nieves et al., 2005; Neusser et al., 2005), cervídeos (Li et al., 2005) e roedores (Fagundes et al., 2000; Marchal et al., 2004), entre outros. Neste contexto, e levando-se em consideração que a pintura cromossômica tem sido amplamente utilizada em estudos citogenéticos e evolutivos em outros grupos, esta técnica poderia caracterizar-se como uma tecnologia muito promissora

na análise de homologias e diferenciação cromossômica em peixes. Os primeiros trabalhos relacionados à microdissecção cromossômica em citogenética de peixes Neotropicais envolveram os cromossomos sexuais de representantes do gênero *Eigenmannia* onde recentemente (Henning et al., 2007 e Sene et al., 2014) utilizaram sondas confeccionadas a partir dos cromossomos X e Y microdissectados de duas espécies do gênero *Eigenmannia* com grande sucesso, realizando inferências sobre a origem dos cromossomos sexuais nas espécies estudadas.

1.3 DNA repetitivo: seu papel na organização do genoma

As sequências de DNA repetitivo constituem a maior fração do genoma dos eucariotos se dividindo em duas classes: repetições em tandem (satélites, minissatélites e microsatélites) e elementos dispersos (transposons e retrotransposons) (Ferreira et al., 2011; Cioffi et al., 2012; Sene et al., 2015). Embora algumas sequências de DNA repetitivo possuam funções claras, como DNA ribossomal, centromérico e telomérico, outras até recentemente foram consideradas como DNA lixo (Biémont e Vieira, 2006). No entanto, estudos demonstram sua grande importância na manutenção da estrutura genômica, sendo sua formação um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka et al., 2005).

Diversos estudos demonstram sua importância no processo de expressão gênica (Liu et al., 2001), recombinação (Biet et al., 1999) e replicação no DNA (Li et al., 2002), tendo também um importante papel na organização estrutural e funcional dos cromossomos e nos processos de diferenciação sexual, como visto em estudos recentes em *Oreochromis niloticus* (Martins, 2007; Ferreira e Martins, 2008) em espécies do gênero *Triplotheus* (Yano et al., 2014) e ainda em espécies do gênero *Eigenmannia* (Sene et al., 2015). Sugere-se, ainda, que estas sequências repetitivas estejam envolvidas em rearranjos cromossômicos, como deleções,

duplicações, inversões e translocações, tendo grande influência nas variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002). As moléculas de RNA ribossomal são codificadas por duas famílias multigênicas distintas, a primeira corresponde ao rDNA 45S que está organizado em matrizes em tandem contendo unidades de transcrição para os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S, enquanto a segunda família ribossomal transcreve o rRNA 5S. As duas classes de rDNA 45S e 5S têm sido extensivamente mapeadas em genomas de peixes (Cioffi e Bertollo, 2012).

Na maioria das espécies, estas duas classes se apresentam em cromossomos diferentes enquanto em outras elas ocorrem em sintenia, como é o caso de todas as espécies estudadas do gênero *Prochilodus*, as quais apresentam sintenia dos genes ribossomais 45S e 5S (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Voltolin et al., 2013). As sequências de DNA ribossomal em peixes apresentam diferentes níveis de variação entre os grupos (Vicari et al., 2010; Ugarkovic & Plohl, 2002), e seus padrões de variação têm sido informativos sobre os processos microevolutivos e filogenéticos desses grupos (Vicari et al., 2008; Molina et al., 2012). Estas sequências podem ser facilmente isoladas e encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma, gerando sinais de fácil visualização após hibridização nos cromossomos (Martins et al., 2006). Os primeiros trabalhos de mapeamento físico através das hibridizações *in situ* utilizando como sondas sequências de DNAs repetidos foram feitos com DNA ribossomais (rDNA) 28S, 18S, 5.8S e 5S (Martins et al., 2006).

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples, consistem de motifs curtos (1 a 6 nucleotídeos de comprimento) organizadas por matrizes em tandem (Cioffi e Bertollo, 2012). Esta região genômica possui a capacidade de dar origem a variantes com um número diferente de repetições, podendo ser organizados em trechos longos que consistem de centenas a milhares de unidades de sequências e geralmente associadas à heterocromatina constitutiva em diversas espécies (Martins, 2007). Os microssatélites estão

presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, desempenhando funções na manutenção e propagação do material genético nuclear, já que várias proteínas se ligam por afinidade a estas sequências (Csink e Henikoff, 1998). Além disso, o estudo das sequências de DNA repetitivo é importante para o conhecimento da estrutura cromossômica, além da origem e evolução dos cromossomos B cuja composição já estudada indica ser principalmente de DNA repetitivo e sexuais, onde as regiões teloméricas dos cromossomos W e Y apresentam um grande bloco heterocromático em relação aos respectivos Z e X (Martins et al., 2004; Galetti & Martins, 2004; Parise-Maltempo et al., 2007; Schemberger et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2011). Estudos evidenciados no genoma de *Hoplias malabaricus*, utilizando 12 diferentes microssatélites resulta na hibridização em regiões subteloméricas e heterocromáticas de vários autossomos, com uma quantidade diferenciada de sinal entre os cromossomos sexuais (Cioffi et al., 2011).

Em estudos com peixes, os dados disponíveis com sondas de DNA 5S demonstram o predomínio a ocorrência de apenas um par cromossômico portador deste gene ribossômico em Siluriformes (Kavalco et al., 2004) e, em alguns casos, mostraram-se eficientes para diferenciar espécies próximas (Garcia, 2005). Já a compactação do genoma dos vertebrados de sangue-frio, no entanto, distingue-se consideravelmente quando comparada à dos vertebrados de sangue-quente e essa diferença seria umas das dificuldades que impossibilitariam a obtenção de bandas longitudinais estruturais nos cromossomos dos peixes (Galetti Jr e Martins, 2004). Esta característica ocasionou um “gap” em relação à nomenclatura, pareamento e descrição de processos estruturais que envolvem determinadas regiões cromossômicas em peixes. O estudo da distribuição cromossômica do DNA repetitivo no genoma de peixes, embora relativamente recente, é uma ferramenta importante na análise da organização genômica e evolução das espécies (Cioffi e Bertollo, 2012).

1.4 Considerações sobre a ordem Siluriformes e a família Heptapteridae

Os peixes da família Heptapteridae estão amplamente distribuídos na região Neotropical, sendo uma das famílias mais representativa dentro da ordem Siluriformes; popularmente são conhecidos como “bagres”, “mandis” e “peixes-gato”. Essa família faz parte da superordem Ostariophysi, que possui 38 famílias, aproximadamente 485 gêneros e 2800 espécies (Nelson, 2006).

Os componentes desta ordem podem ser facilmente identificados morfologicamente devido à presença de um corpo nu envolto por pele espessa e que pode apresentar-se total ou parcialmente coberto por placas ósseas (Britski et al., 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo que nas nadadeiras dorsais e peitorais o primeiro raio se apresenta como um acúleo forte e pungente; as nadadeiras adiposas encontram-se geralmente presentes e bem desenvolvidas, enquanto a nadadeira caudal assume formato variável. Caracterizam-se, ainda pela presença de três pares de barbilhões sensitivos (Mees, 1974).

Os exemplares nas diferentes espécies se apresentam com tamanhos característicos, desde pequeno até grande porte e hábitos sedentários, que contribuem para dificultar a superação de obstáculos como cachoeiras ou corredeiras que se interpõem às suas raras migrações. Ocupam geralmente o fundo dos rios, escondendo-se por entre as pedras e a vegetação (Britski, 1981) e são caracterizados por desenvolverem atividades predominantemente crepusculares ou noturnas, quando saem à procura de alimento constituído principalmente por vermes e insetos, utilizando-se principalmente de seus sentidos químicos (olfato e gustação) (Sterba, 1973).

Os estudos taxonômicos envolvendo os representantes deste grupo realizados por Lundberg et al., (1991a; 1991b) e de Pinna (1998) reconheceram a existência de três grupos monofiléticos dentro da família Pimelodidae, equivalentes às subfamílias Pimelodinae,

Heptapterinae (Rhamdiinae) e Pseudopimelodinae. Estudos filogenéticos e de características morfológicas elevaram estes grupos à categoria de famílias (Nelson, 2006; Ferraris, 2007). Nesse sentido, os estudos citogenéticos auxiliaram no estabelecimento das três famílias, que apresentaram números diplóides predominantes característicos de 54, 56 e 58 cromossomos em Pseudopimelodidae, Pimelodidae e Heptapteridae, respectivamente (Swarça et al., 2000; Garcia, 2005; Martinez et al., 2008 a Kante et al., 2015).

A família Heptapteridae é composta por 25 gêneros sendo eles: Acentronichthys, Brachyglanis, Brachyrhamdia, Cetopsorhamdia, Chasmocranus, Gladioglanis, Goeldiella, Heptapterus, Horiomyzon, Imperales, Imparfinis, Leptorhamdia, Mastiglanis, Medemichthys, Myoglanis, Nannoglanis, Nannorhamdia, Nemuroglanis, Pariolinus, Phenocorhamdia, Pimelodella, Rhamdella, Rhamdia, Rhamdioglanis e Rhamdiopsis. Já a família Pimelodidae é atualmente formada por 32 gêneros, enquanto a família Pseudopimelodidae é representada por quatro gêneros (Lundberg et al., 1991; Pinna, 1998).

Os representantes da ordem Characiformes, juntamente com os da ordem Siluriformes, representam os grupos que concentram o maior número de informações citogenéticas. No entanto, a maioria das publicações de estudos citogenéticos sobre este último grupo são mais recentes, restringindo-se somente a algumas espécies dos gêneros Pimelodella e Rhamdia, da família Heptapteridae, sendo os primeiros estudos documentados por Toledo e Ferrari (1976). Os resultados citogenéticos obtidos com as espécies já analisadas revelam uma macroestrutura cariotípica que pode variar de 42 a 62 cromossomos (Toledo e Ferrari, 1976; Margarido e Moreira-Filho, 2008), com predomínio das espécies apresentando número diplóide de 58 cromossomos. Deste modo o número fundamental (NF) apresenta-se relativamente alto, variando de 84, como visto em Pimelodella sp. (Toledo e Ferrari, 1976) a 116, encontrado em Rhamdia quelen (Maistro et al., 2002; Garcia et al., 2003), com predomínio de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos.

Neste grupo de peixes os cromossomos geralmente apresentam tamanho reduzido, o que dificulta a identificação da sua morfologia e a localização de bandas. Polimorfismos estruturais e numéricos vêm sendo frequentemente descritos entre os representantes da família Heptapteridae, na forma de triploidia natural (Garcia et al., 2003; Silva et al., 2008), ocorrência de cromossomos B ou supranumerários (Almeida-Toledo et al., 1992, Almeida-Toledo e Garcia, 2008) e de sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY (Dias e Foresti, 1993; Almeida-Toledo e Garcia, 2008), além de variações no número e distribuição dos blocos heterocromáticos (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Almeida-Toledo e Garcia, 2008).

Estudos específicos da heterocromatina constitutiva entre os representantes da família Heptapteridae foram realizados no gênero *Rhamdia*; entretanto, informações mais detalhadas sobre as características destes segmentos genômicos ainda são escassos. Fenocchio e Bertollo (1990), Fenocchio et al., (2000) e Maistro et al., (2002) encontraram apenas pequena quantidade de heterocromatina distribuída pelo genoma das espécies, com as bandas apresentando-se pálidas quando estudaram populações de *Rhamdia hilarii*, enquanto as RONS mostraram coincidência com regiões heterocromáticas, bem como em ambas as regiões teloméricas de alguns cromossomos metacêntricos. Contudo, relatos da ocorrência de cromossomos supranumerários em Heptapterídeos têm se mostrado pouco frequentes, sendo restritos a alguns gêneros como em *Pimelodella* (Almeida-Toledo et al., 1992; Almeida-Toledo e Garcia, 2008) e *Rhamdia*, onde apresentam marcante polimorfismo numérico, podendo variar entre um a sete cromossomos.

Espécies que mostraram uma macroestrutura cariomórfica conservada como a família Heptapteridae puderam ser diferenciadas pela aplicação de diferentes técnicas como bandeamentos cromossômicos do tipo bandamento C, para evidenciar as regiões ricas em heterocromatina, localização das regiões organizadoras de nucléolos funcionalmente ativas na

interfase anterior pela coloração com Nitrato de Prata (Ag-NOR), além da aplicação da técnica de FISH, que proporciona a localização *in situ* de sequências de DNA nos cromossomos metafásicos. A inclusão da aplicação de técnicas moleculares nos estudos cariotípicos permitiram abordagens sobre aspectos evolutivos neste grupo.

1.5 Análise dos padrões de coloração em peixes: transcriptoma como ferramenta

Estudar os padrões de coloração é fundamental para compreender o processo evolutivo, assim entender como os genes se relacionam no desenvolvimento do fenótipo destes organismos. Interações positivas, como as associações mutualistas, pode ter um papel importante na manutenção da estrutura da comunidade, e compensar os efeitos negativos da concorrência sobre nichos específicos. Um único estudo, realizado em borboletas com mimetismo Mulleriano, evidenciou de forma convincente que borboletas imitadoras convergem espacialmente, considerando a utilização do habitat, ao passo que o consumo de recursos e nicho trófico foram indiretamente inferidos como correlacionados a outras variáveis (como a estrutura da floresta, topografia e altura de vôo) (revisão em Alexandrou et al., 2011). Como ferramenta para os estudos foram primeiras tentativas foram propostas para o sequenciamento do genoma humano constituíram apenas o começo de um grande avanço da era moderna de sequenciamento de DNA, que resultaram no desenvolvimento de novas estratégias e sequenciamento de milhares de genes de uma só vez através da quantificação dos níveis de mRNA, para criar uma imagem da função celular. Esses avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento permitiram gerar transcriptomas em quase todas as espécies de interesse (revisão em Yang et al, 2014).

Quando sequencias do genoma não estão disponíveis, o sequenciamento do transcriptoma se apresenta como uma abordagem rápida e eficaz para a obtenção de genes

codificadores de proteínas. Estudos recentes realizados por Yang et al (2014) geraram o primeiro transcriptoma do peixe *Gymnoditychus pachycheilus* utilizando tecnologia de sequenciamento de alto rendimento. A caracterização do transcriptoma de forma abrangente e evolutiva foi posteriormente utilizada em análises conjuntas com outros genomas de peixes disponíveis para investigar e elucidar possíveis mecanismos de adaptação. Outro estudo realizado mostrou as vantagens no sequenciamento do transcriptoma de *Tripterygion delaisi* realizado a partir de análises do cérebro no período reprodutivo e evidenciou a plasticidade fenotípica como um fator importante na expressão diferencial de genes relacionados ao dimorfismo sexual nessa espécie (revisão em Schunter et al. 2014).

No que se refere à anotação e análise genômica, a utilização de transcriptomas mostrou-se uma solução promissora na resolução de questões particulares, como no caso da espécie de ave *Parus major*, em que foram utilizadas as sequências transcritas de RNA a fim de construir um primeiro transcriptoma de referência para esse grupo de organismos (Santure et al. 2011) e permitiu também a investigação de genes parálogos, splice variantes e a distribuição de microssatélites de músculo esquelético em dourada (*Spaurus aurata*) (Serrana et al. 2012). Outro estudo interessante realizado em peixes da família *Corydoradinae* Alexandrou et al. (2011) evidenciaram características que os tornam uma espécie fascinante para estudar a evolução dos padrões de pigmentação dos vertebrados. A investigação da base genética do mimetismo e da evolução convergente do padrão de coloração foram importantes para entender os processos de adaptação e a coevolução conduzidas pela predação, além de evidenciar que o grupo passou por uma série de duplicação do genoma inteiro.

Inúmeros trabalhos relatam estudos sobre a análise do perfil transcricional em respostas a diferentes variações ambientais e condições biológicas. Contudo, até o presente momento, pouco se sabe em relação a análise de transcriptomas de espécies da família *Heptapteridae*. Considera-se, pois, que a comparação desses dados com os de outras espécies

da mesma família e de famílias relacionadas permitirá compreender a importância e o papel dos genes envolvidos na determinação do padrão de coloração em peixes.

5 Considerações finais

O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos de Citogenética e Genética Molecular de Peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu), visando aumentar o conhecimento sobre a composição cariotípica e a estrutura molecular dos peixes, estudando de modo mais específico a composição cariotípica e as características estruturais dos cromossomos das cinco espécies mais representativas da família Heptapteridae.

Os estudos citogenéticos realizados nas espécies *Rhamdia quelen*, *Pimelodella vanhadavae*, *Cetopsorhamdia iheringi*, *Heptapterus mustelinus* e *Imparfinis mirini* trouxeram informações significativas relacionadas aos processos de diversificação cromossômica, às relações entre os componentes desta família de peixes e à evolução cariotípica neste grupo. Os representantes analisados evidenciaram uma variação cariotípica de $2n=46$ a $2n=58$ cromossomos, sendo $2n=58$ cromossomos o número diploide predominante. As análises citogenéticas convencionais com bandamento C revelaram que os segmentos de heterocromatina são escassos, sendo os blocos heterocromáticos encontrados em pequena quantidade e distribuídos pelo genoma, demonstrando uma prevalência de bandas pálidas e pouco evidentes em todas as espécies estudadas.

O mapeamento cromossômico dos genes de DNA ribossomal 5S e 18S mostrou diferentes padrões de distribuição nas espécies analisadas. Enquanto as espécies *Cetopsorhamdia iheringi* e *Imparfinis mirini* apresentaram essas duas sequências de DNAr em sintenia, nas demais espécies as marcações foram identificadas em cromossomos distintos. Essa condição possivelmente se deve ao fato destas sequências terem passado por processos evolutivos independentes e, em decorrência, possuírem dinâmicas funcionais diferentes. Desta forma, o distanciamento físico destes dois tipos de sequências poderia

constituir um cenário mais interessante para um melhor desempenho das suas funções fisiológicas.

No presente estudo foi aplicada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para analisar a distribuição de diferentes sequências microssatélite no genoma utilizando os oligonucleotídeos marcados (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀. Marcações conspícuas fluorescentes foram identificadas preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, sendo que alguns sinais também foram observados tanto em regiões eucromáticas como heterocromáticas dos cromossomos, mostrando a contribuição destas sequências repetitivas na diversificação cromossômica das espécies analisadas. Tais informações vêm se juntar ao crescente entendimento do papel das sequências de DNA repetitivo na estruturação e funcionamento do genoma e, neste caso nas principais espécies da família Heptapteridae.

Além das análises citogenéticas também foi realizado um estudo envolvendo as espécies *Rhamdia quelen* e *Pimelodella avanhadavae*, utilizando o transcriptoma como ferramenta para identificação da ocorrência dos genes relacionados à cor e sua atuação no desenvolvimento de padrões de coloração em peixes. A comparação dos dados obtidos e sua aplicação em outras espécies de peixes da mesma família e de grupos relacionados poderão resultar numa melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na determinação dos padrões de colorido nestas espécies, bem como da importância e desempenho dos genes envolvidos nestes processos.

6 Referência Bibliográficas

- Abucarma M and Martins-Santos IC. (2001). Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçu basin. *Cytologia* 66: 299-306.
- Alexandrou M, et al. (2011). Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. *Nature* 469: 84-86.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. (2000b). Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In: *Chromosome Today Switzerland*: Birkhauser Verlag 13:169-182.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, and Toledo-Filho AS. (1992). Cytogenetic analysis of the blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255-262.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F. (2001). Morfologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. *Genética* 76767.111: 1-3.
- Almeida-Toledo LF, Garcia C. (2008). Snálises cromossômicas comparativas em espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): ocorrência de cromossomos sexuais e polimorfismos estruturais e numéricos. *Anais XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG.
- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of *Hypostominae* (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 128:1-9.
- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C. (2006). Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica* 127: 243-252.
- Alves-Gomes JA. (2001). The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective, *Journal of Fish Biology* 58: 1489–1511.

- Amici A, Rollo F. (1991). The nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene of *Pyenophora graminea*. *Nucleic Acids Research* 19:5073.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA. (1993). Chromosome studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes, Loricaridae): II. ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterocromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63:215-220.
- Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R. (2003). Catfishes. 2 vol., Phmouth: Science Publischers 844p.
- Artoni RF, Bertollo LAC. (2002). Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89: 15-19.
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SDM. (1986). Microdissection and microclonning from the short arm of human chromosome 2. *Molecular and Cellular Biology* 6:3826-3830.
- Bertollo LAC, Cavallaro ZI. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish *Triportheus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 60: 60-63.
- Bertollo LAC, Mestriner CA. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* II Meiotic analysis. *Chromosome Research* 6:141-147.
- Biémont C and Vieira C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521-524
- Biet E, Sun J, Dutreix M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of sDNA secondary structure. *Nucl. Acid. Res.*, v.27, p.596- 600.
- Bitencourt JA, Affonso PRAM, Giuliano-Caetano L, Carneiro PLS, Dias AL. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus aff. unae* from northeastern Brazil. *Genet Mol Res* 11:933–943
- Bockmann FA. (1994). Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catsh from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily

- Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). Proceedings of the Biological Society of Washington 107: 760–777.
- Bockmann FA. (2007). Família Heptapteridae. In: Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil (Buckup PA, Menezes NA and Ghazzi MS, eds.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, 104-109.
- Bockmann FA, Guazelli GM. (2003). Heptapteridae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., and Ferraris, Jr., C. J. (eds.). Check list of Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), 1st edition. Edipucrs, Porto Alegre 406–431.
- Borba, RS, Parise-Maltempi, PP, and Alves, AL. (2009). Tendência da evolução cariotípica na família Heptapteridae (Teleostei: Siluriformes). In: Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia.
- Borba RS, Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP, Alves AL. (2011). Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22: 509-518.
- Britski HA. (1981). Peixes de água doce. In: Carvalho, J.C.M. (Coord.) Atlas da fauna brasileira. Melhoramentos, São Paulo, SP 84-93 pp.
- Britski HA, Sato Y, Rosa ABS (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3^a ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação - CODEVASF 115p.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23 Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira Filho O. (2002). A ZZ-ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). Caryologia 55:139-150.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). Hereditas 138: 213-218.

- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in Eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- 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, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D et al. (2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet* 5:28
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012) Review Paper. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, 80: 2125–2139.
- Cole CJ, Levans CR. (1971). Chromosome preparations of amphibian and reptiles: improved technique. *Herpetology* 3:102-1971.
- Dawe RK. (2003). RNA interference, transposons, and the centromere. *The Plant Cell Online*, 15: 297-301.
- de Pinna MCC (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba, LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Edpurcs, Porto Alegre, Brasil 279-330.
- de Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2004). Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paraná River basin of Brazil. *Folia Biol.* 52: 165-169.
- Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Nuikawa N. (1992). Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Human Genetics*, 89:13-17.
- Dias AL, Foresti F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev Brasil Genet* 16:585–600

- Dimitri P, Junakovici N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends in Genetics* 15: 123-124
- 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.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC. (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae), *Genetica* 81: 193–198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JP. (2000). Considerations on B-chromosome origin and distribution in fish populations of genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* 48, 105-109.
- Fenocchio AS, Swarça AC, Dias AL, Cestari MM. (2002). Caracterização Cromossômica (Giemsa, Bandas C, NORS, CMA3 e FISH) de *Rhamdia quelen* do Alto Rio Iguaçu (Estado do Paraná). In: Anais do IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Dias AL, Swarça AC. (2003). Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae), *Cytologia* 68:363-368
- Ferraris Jr CJ. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Ferraris Jr CJ. (1988). Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthyes: Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 101: 509–516.
- Ferraris Jr CJ. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1–628.
- Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F. (2011a). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *MobGen- et Elements* 1:1–6.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. (2011b). Chromosome mapping of retrotransposable

- elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res* 132:64–70.
- Ferreira IA, Martins C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Fink SV, Fink WL. (1981). Interrelation ships of the ostariophysan fishes(Teleostei). *Zool J Linnean Soc* 72:297-353.
- Fonseca YM, Oliveira C, Foresti F, Maistro EL. (2003). First cytogenetic description of the species *Rhamdela microcephala* (Pisces, Heptapteridae), *Cytologia* 68: 31–34.
- Foresti F, Toledo FS, Almeida-Toledo LF. (1981). Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics Cell Genetics* 31: 134-141.
- Galetti Jr PM, Martins C. (2004). Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra M (Ed). *Fluorescence in situ hybridization: conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto, SBG 61-88.
- Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L. (2003). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae), *Cytologia* 68: 403-411.
- Garcia C. (2005). Contribuição aos estudos citogeneticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do Rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Garcia C, Almeida-Toledo LF. (2006). Conservação cariotípica em populações de Imparfinis (Siluriformes, Heptapteridae) das bacias do Mogi-Guaçu, Paranapanema e Paraíba do Sul. In: *Brazilian Symposium of Fish cytogenetics and Genetics. International Congress of Fishes Genetics*, SBG São Carlos, 110.
- Garcia C and Moreira-Filho O. (2008). Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genet. Mol. Biol*, 31: 261-264.
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia*

- quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9: 365–384.
- Garcia C, Almeida-Toledo LF. (2010). Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms *Caryologia* 63:32–40
- Gouveia JG, Moraes VPO, Sampaio TR, da Rosa R, Dias AL. (2012). Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23: 215-227.
- Griffiths, SP (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.* 57: 1453–1464.
- Hashimoto DT, Porto-Foresti F. (2010). Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop Ichthyol*, 8(4):861-866.
- Hatanaka TE, Gatetti PM Jr. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239–244
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121: 55-58.
- Hochberg VBM, Erdtmann B. (1988). Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Bras. Gent.* 11: 563-576.
- Howel WM, Black DA. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hu L, Sham JS, Tjia WM., Tan YQ, Lu GX, Guan XY. (2004). Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection.

Genomics, 83: 298-302.

Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P. (2005). Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. Cytogenetic and Genome Research 110: 426-440.

Jain D, Hebden AK, Nakamura TM, Miller KM, Cooper JP. (2010). HAATI survivors replace canonical telomeres with blocks of generic heterochromatin. Nature 467: 223–227. doi: 10.1038/nature09374

Jesus CM, Galetti-Júnior PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. Genetica 118: 25-32.

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. (2005). Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. Cytogenet Genome Research 110: 462-467

Kantek DLZ, Peres WAM, Buckup PA, Moreira-Filho O. (2009). Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil, Zoologia 26:733–738.

Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.

Katagiri T, Asakawa S, Minagawa S, Shimizu N, Hino I, Aoki T. (2001). Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. Animal Genetics 32: 200–204.

Kavalco, KF; Pazza, R; Bertollo, LAC.; Moreira-Filho, O. (2004). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river Basin, Brazil. Cytogenet. Genome Res 106:107-110

Kejnovský E, Michalovova M, Steflova P, Kejnovska I, Manzano S, Hobza R, ... Vyskot B. (2013). Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. PloS One, 8(1), e45519.

Kelsh RN, et al. (1996). Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. Development 123, 369-389.

- Kidwell MG. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63
- Kocher TDW, Lee H, Sobolewska D, Penmanad B, Mcandrew. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Genetics* 148: 1225-1232.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* 51:350–6.
- LeGrande WH. (1981). Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes, Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus* Copeia 1:33–52.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220
- Li YC, Kord AB, Fahima T, Berles A, Nero E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465.
- Li YC, et al. (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma* 114: 28-38.
- Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. (2001). Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 289:317-324.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. (1989). Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338: 348-350.
- Lundberg JG, Bornbush AH, Mago-Leccio F. (1991a). *Gladioglanis conquistador* n. sp. from Ecuador with Diagnoses of the Subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes: Pimelodidae), *Copeia* 1: 190–209.
- Lundberg JG, Mago-Leccia F, Nass P. (1991b). *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from deep river channels of South

- America, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proc Biol Soc Wash* 104: 840-869.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. (2002). Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, silver nitrate and Cma3 staining and Restriction Endonuclease banding. *Cytologia* 67: 25-31.
- Mandrioli M. (2000). Mariner-Like transposable elements are interspersed within the rDNA- associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Res* 8:177–179.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, Sánchez A. (2004). X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* 12: 767-776.
- Margarido VP, Moreira-Filho O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genet Mol Biol* 31:235–238.
- Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. (2004). Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay river basin, Mato Grosso, Brazil, *Caryologia* 57:327–331.
- Martinez ERM, Nirchio M, Granado A, Foresti F, Oliveira C. (2008). Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes), *Genet Mol Biol* 31:692–696.
- Martins C, Galetti Jr. PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chrom Res* 8: 353-355.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempo PP, Wright JM, Foresti F (2002). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: Repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci, *Cytogenetic and Genome Research* 98: 78-85.

- Martins C, Oliveira C, Wasko AP, Wright JM (2004). Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes – a review. *Aquaculture*, 231 : 37-49.
- Martins C, Wasko AP. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, ed, *Focus on Genome Research*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, 289-318.
- Martins C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome: In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.
- Mees, GF (1974). Auchenipteridae and Pimelodidae. *Zool. Verh* v.132:115-246
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics*, 1: 24-28.
- Meltzer PS, Guan XY, Su AS, Gracia E, Trent JM. (1997). Identification of region specific genes by chromosome microdissection. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 93: 29-32.
- Milani D; Cabral-de-Mello, DC. (2014). Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes. *PLoS One*, 9:5.
- Molina WF, Schmid M, Galetti Jr. PM .(1998). Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94: 141-149
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46: 115-125.
- Nelson SJ. (2006). *Fishes of the world*. 4 th. Ed. United States of America. John Wiley & Sons. 600p.
- Neusser M, Münchb M, Anzenbergerb G, Müllera S. (2005). Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae

- (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 108: 191-196.
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry MD. (2005). Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genetics and Molecular Research* 4: 675-683.
- Nuntakarn L, Mevatee U, Withyachumnarnkul B, Leardkamolkarn V, Fuchareon S. (2002). Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*, 28:1-9.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho AS. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Ver. rasil. Genet* 11:577-624.
- Oliveira C, Gosztonyi AE (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution. Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F. (2011) Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*, 78: 183-194.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F. (2006) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes (Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kaapoor BG. eds) *Fish Cytogenetics*. USA. Science Publisher. 111-152.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet. Gen. Res.*, v.116, n.3, p.218-223.
- Pendas AM, Moran P, Garcia-Vazquez E. (1993). Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Res* 1:63-67
- Phillips RB, Reed KM. (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture* 140: 197-216.

- Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C. (2011). The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evolutionary Biology*, 11:151.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938
- Pinna MC. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical siluriforms (Teleostei: Ostario-physi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Vari RE, Lucena ZM, Lucena CA (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 279–330.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. (2003). *Check List of freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 742 p.
- Roman, M. P., and Margarido, V. P. (2000). Estudos citogenéticos em três gêneros de Siluriformes (PISCES) coletados no Rio Iguaçu Quedas do Iguaçu Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado A, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD. (2014). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*.
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias ALB. (2011). Microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comp Cytogenet* 5:301–313
- Santure A, Gratten J, Mossman J, Sheldon B, Slate J. (2011). Characterization of the transcriptome of a wild great tit *Parus major* population by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 12:283.
- 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.

- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F.(2015). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium*: genomic organization and the diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenet Genome* doi: 10.1159/000437165
- Schaefer SA. (1998) Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of Neotropical cascudinhos (Siluroide: Loticaridae). In: *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*.(Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucana CAS, eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E and Pascual M (2014). Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC Genomics*. 15:167.
- Schwartz JH (2001). The many dimensions of cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98. 24: 13482–4.
- Sene V, Pansonato-Alves J, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F. (2014). Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Comparative Cytogenetics* 8(4): 301-311.
- Sene et al. (2015) Mapping of the Retrotransposable Elements Rex1 and Rex3 in Chromosomes of *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Cytogenetic and Genome Research*. 146: 319-324
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. (1990). Microdissection of banded human chromosomes. *Human Genetics*, 84: 507-511.
- Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston I. (2012). Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing.13:181.
- Silva M, Camargo EF, Almeida MC, Ludwi LAM. (2008). Monitoramento citogenético aplicado ao repovoamento de *Rhamdia* (Siluriformes, Heptapteridae) do rio Iguaçu.
- Sola L, De Innocentiis, S., Gornung, E. et al. (2000). Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Mar. Biol.* 137: 47–51.

- Stivari MK and Martins-Santos IC. (2004). Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptateridae). *Cytologia* 69:25–43.
- Stolf R, Swarc a AC, Guiliano-Caetano L, Dias AL. (2004). Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil, *Caryologia* 57:348–352.
- Sumner AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. *Exp Cell* 75: 304-306.
- Taguchi T, Akimaru K, Hirai H, Hirai Y, Mwenda JM, Taguchi KY. (2003). A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Research* 11: 147-52.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenet. Genome Res* 122:67–72.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho, O, Bertollo LAC, Artoni RF. (2010). Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76:1094-1116.
- Voltolin TA, Pansonato Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto- Foresti F. (2013). Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res.*141:206–211
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. (2003). Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30 347–358.
- Wiltshire RN, Dennis TR, Sondak VK, Meltzer PS, Trent JM. (2001). Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 131: 97-103.
- Sumner, AT. (2003). *Chromosomes: organization and function*. London: Blackwell Publishing Company.

- Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL. (2003b). Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119:87–92.
- Swarça AC, Vidotto AP, Dias AL. (2003). Cytogenetic characterization of *Pimelodella avanhandave* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná state, Brazil), *Caryologia* 56: 421–425.
- Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL. (2007). An update cytogenetic review for species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia* 60:338-348
- Telenius H et al. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13: 718-25.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, Passos KB, Feldberg E (2013). Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. *Sexual Development*, 7(6), 325–33.
- Toledo, V. & Ferrari, I. (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): cromossomo marcador. *Científica* 4: 120-123
- Torres GA, Gong Z, Iovene M, Hirsch CD, Buell CR, Bryan GJ, Novák P, Macas J, Jiang J. (2011). Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *Genetics* 1: 85–92. doi: 10.1534/g3.111.000125
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967–81.
- Tsuda JR, de Moraes VPO, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2010). Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9: 1929-1935.
- Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ruas CF, et al. (2002). Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67:9-13.

- Vasconcelos C, Martins-Santos IC. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* 132: 103-109.
- Vidotto AP, Swarça CA, Fenocchio AS, Dias AL. (2004). Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil), *J Hered* 95:517–520.
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C. (1997). A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* 62:61–66
- Vissoto PC, Foresti F, Oliveira C. (1999). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes), *Chromosome Sci.* 3:9-13.
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C. (2001) Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Sci* 5:97–103
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. (2003). Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30 347–358.
- Yano CF, Margarido VP. (2012). First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family, *J Fish Biol* 81:939–953.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triplotheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes, *Plos ONE* 9(3), 1–7.
- Yang XF, Wang CY, Chen CH, Zhang H, Tian ZR, Li X, et al. (2014). Chromosome constitution and origin analysis in three derivatives of *Triticum aestivum*—*Leymus mollis* by molecular cytogenetic identification. *Genome* 57: 583–591.