

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Citogenética comparativa de peixes da família Cichlidae

Andréia Benedita Poletto

Botucatu-SP
Julho 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Citogenética comparativa de peixes da família Cichlidae

Andréia Benedita Poletto

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

Orientador: Prof. Dr. Cesar Martins

Botucatu-SP
Julho 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Poletto, Andréia Benedita.

Citogenética comparativa de peixes da família Cichlidae / Andréia Benedita Poletto. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Cesar Martins

Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética 2. Citogenética

CDD 574.92

Palavras chave: Ciclídeos; Citogenética; Cromossomos B; Peixes

Dedico este trabalho aos meus pais José Antonio (in memorian) e Joanna em gratidão pela vida, e também pelo zelo e amor que devotaram à minha criação.

RECOMEÇAR

Paulo Roberto Gaefke

Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
é renovar as esperanças na vida e o mais importante...
acreditar em você de novo.

Sofreu muito nesse período?
Foi aprendizado...
Chorou muito?
Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia...

Sentiu-se só por diversas vezes?
É porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido?
Era o início da tua melhora...
Pois é... agora é hora de reiniciar...
de pensar na luz...
de encontrar prazer nas coisas simples de novo.

Um corte de cabelo arrojado...
diferente?
Um novo curso...
ou aquele velho desejo de aprender a pintar... desenhar... dominar o computador...
ou qualquer outra coisa...

Olha quanto desafio...
quanta coisa nova nesse mundo
de meu Deus te esperando.
Tá se sentindo sozinho?

Besteiras...
tem tanta gente que você afastou com o seu "período de isolamento"...
tem tanta gente esperando um sorriso teu para "chegar" perto de você.

Quando nos trancamos na tristeza...
nem nós mesmos nos suportamos...
ficamos horríveis...

o mau humor vai comendo nosso fígado...
até a boca fica amarga.

Recomeçar...
hoje é um bom dia para começar novos desafios.

Onde você quer chegar?
Ir alto... sonhe alto...
queira o melhor do melhor...
queira coisas boas para a vida...
pensando assim trazemos pra nós aquilo que desejamos...

se pensamos pequeno...
coisas pequenas teremos...
já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente
lutarmos pelo melhor...
o melhor vai se instalar na nossa vida.

E é hoje o dia da faxina mental...
joga fora tudo que te prende ao passado...
ao mundinho de coisas tristes...
fotos... peças de roupa, papel de bala...
ingressos de cinema, bilhetes de viagens...
e toda aquela tranqueira
que guardamos quando nos
julgamos apaixonados...
jogue tudo fora...
mas principalmente...
esvazie seu coração...

fique pronto para a vida...
para um novo amor...
Lembre-se somos apaixonáveis...

somos sempre capazes de amar muitas vezes
e muitas vezes...
afinal de contas...
Nós somos o "AMOR"..

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo milagre da vida que a todo instante se renova sobre o nosso planeta e cuja fascinante beleza, diversidade e complexidade sustentam nosso anseio por desvendá-la.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Martins pela confiança, incentivo, amizade e orientação para a elaboração e conclusão deste trabalho.

A FAPESP, CNPq e CAPES pela bolsa e pelos recursos financeiros destinados aos projetos do laboratório.

Ao Prof. Dr. Thomas D. Kocher e sua equipe da Universidade de Maryland em College Park, MD, USA, por tão prontamente ter me acolhido e por todo o auxílio e ensinamento recebidos durante o meu estágio.

A Fazenda Entre Rios e ao Senhor Arthur Antonângelo pelo apoio nas coletas realizadas no Rio Araguaia, em São Félix do Araguaia, MT.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Venere pela amizade e pelo apoio durante as coletas e pela identificação dos peixes coletados.

Ao professor Issakar Lima Souza pela amizade e pelo incentivo para eu prosseguir nos meus estudos.

Aos Professores Dr. Fausto Foresti, Dr. Cláudio Oliveira, Dra Adriane P. Wasko pelo companheirismo e aprendizado.

Ao professor Ricardo Benine pela paciência e atenção com que sempre esclarece minhas dúvidas “cladísticas”, e também pela amizade.

Aos amigos do Departamento de Morfologia, em especial aqueles do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, sendo que alguns se tornaram verdadeiros amigos.

Aos amigos do Laboratório de Genômica Integrativa pelos bons momentos dentro e fora do Laboratório.

Ao meu amigo e Técnico Renato Devidé, pelos seus ensinamentos técnicos e pela amizade.

À querida Dona Tera, pelos cafés, doces, bolos, e principalmente pelo carinho e amizade com que a todos nos trata e por sua exemplar incansável disposição a todos servir.

Ao meu amigo Patrick Hershey por todo apoio, atenção e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1 Biologia e evolução dos ciclídeos	8
1.2 Citogenética de Cichlidae	20
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Espécies utilizadas	30
3.2 Metodologia	31
3.2.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos por de preparações diretas	31
3.2.2 Obtenção dos cromossomos meióticos	32
3.2.3 Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandeamento C)	33
3.2.4 Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs	33
3.2.5 Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência – FISH	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Capítulo I: Chromosomal evolution and speciation in fishes of the family Cichlidae	38
4.2 Capítulo II: Accumulation of 18S rDNA and repetitive DNA sequences in the B chromosomes of the African cichlid fish <i>Haplochromis obliquidens</i>	65
4.3 Capítulo III: Female associated B chromosome in the cichlid fish <i>Metriaclima lombardoi</i>	84
5. CONCLUSÕES GERAIS	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Resumo

Este trabalho teve por objetivo analisar citogeneticamente espécies da família Cichlidae de diferentes origens. Foram feitas análises de uma espécie asiática, de 22 africanas e 30 neotropicais. O número diplóide na família variou de $2n=40$ a $2n=60$. Os sítios de genes de RNAr 18S variaram de 2 a 9 cromossomos portadores, com sítios terminais para os africanos e em apenas um grande par cromossômico em posição intersticial ou terminal para a maioria dos neotropicais. A hibridação do gene RNAr 5S marcou sítios múltiplos em regiões intersticiais e centroméricas em duas espécies africanas, enquanto que nos ciclídeos neotropicais marcou de um a dois pares, sempre em posição intersticial. Em *Haplocromis obliquidens* foram encontrados um a dois grandes cromossomos metacêntricos supernumerários e heterocromáticos em 39,6% da população, tanto em fêmea quanto em macho. Este cromossomo B apresentou sítios múltiplos de hibridação de DNAr 18S e sinais leves na região centromérica do DNA satélite centromérico SATA. Sequências repetitivas inseridas em BACs hibridaram de forma difusa por toda a extensão do elemento supernumerário. Esse cromossomo B pode ter se originado a partir de um isocromossomo, ou por acúmulo de DNA repetitivo num pequeno proto-cromossomo B. Em *Metriaclima lombardoi* um grande cromossomo B metacêntrico e heterocromático foi detectado em 50% das fêmeas e em nenhum macho. Este elemento não apresentou sinais de hibridação de DNAr 18S, porém DNAs repetitivos inseridos em BACs hibridaram nos braços menores do primeiro par do complemento A, fortemente na região centromérica, e de forma difusa ao longo do cromossomo B. Hipotetizamos que este cromossomo B pode ter se originado a partir de um fragmento do primeiro par do complemento A, tendo acumulado DNAs repetitivos como consequência da ausência de recombinação. Sugerimos também que a origem do cromossomo B a partir do primeiro par cromossômico poderia estar levando os seus portadores a apresentar as características orgânicas de fêmeas, independentemente do sexo genômico, pois já foram localizados anteriormente genes de determinação sexual no primeiro grande par de cromossomos de tilápias, que possui homologia com o primeiro par dos haplocromíneos. Pode-se concluir que os peixes ciclídeos apresentam padrões específicos de variação estrutural e numérica nos cromossomos, provavelmente devido à atuação de diferentes forças evolutivas, em face de ocuparem diferentes ambientes e terem passado por diferentes modos de especiação. Os cromossomos Bs encontrados nas duas espécies africanas provavelmente surgiram independentemente nas duas linhagens, pois apesar de ambos serem metacêntricos, possuem diferentes padrões tanto de herança quanto de hibridação de sequências repetitivas.

Abstract

This work had the aim of cytogenetic analyses of Cichlidae species from diverse origin. It was analyzed one asian, 22 african and 30 neotropical species. The diploid number ranged between $2n=40$ and $2n=60$ chromosomes. The 18S rRNA gene sites varied from two to nine bearer chromosomes, in terminal position for the africans ones, and just in one large chromosome pair, in interstitial or terminal position, for the majority of the neotropical ones. The hybridization with 5S rRNA genes labeled multiple sites in two African species, in centromeric and interstitial position, whereas in the Neotropical cichlids it labeled interstitially in one to two pairs of chromosomes. In *Haplochromis obliquidens* it was found one or two metacentric supernumerary heterochromatic chromosome(s) in 39,6% of the population including males as well as females. This B chromosome showed multiple hybridization sites of 18S rDNA and the SATA centromeric satellite DNA slightly labeled in the centromeric region, while BAC-clone enriched of repeated sequences hybridized scattered along the B chromosome. This B chromosome could have originated from an isochromosome or by accumulation of repetitive DNA in a small proto-B chromosome. In *Metriaclima lombardoi* a large heterochromatic metacentric B chromosome was detected in 50% of females and none males. This element did not show signals of hybridization of 18S rDNA but BAC-clone enriched of repeated DNAs hybridized in the small arms of first pair of complement, strongly in the centromeric region, and scattered along the B chromosome. We hypothesized that this B chromosome could have originated from a fragment of the A complement, and had accumulated repetitive DNAs as consequence of absence of recombination. We also suggest that the origin of this B from the first chromosome pair could be driving the bearer individuals to present female characteristics independently of the genomic sex, because it was previously found sex determination genes in the first large pair of Tilapia chromosomes, which has homology with the first Haplochromines chromosome pair. The present work make it possible to conclude that Cichlid fishes show specific patterns of variation in the chromosomes, probably due to diverse forces acting on their evolution, because they occupy different habitats and have undergone different modes of speciation. The B chromosomes found in the two african species, probably arisen independently in the two lineages, despite both being metacentric, they have different patterns of transmission as well as repetitive sequence hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

Figura 1 - Distribuição dos ciclídeos de acordo com a fragmentação do continente de Gondwana.....12

Figura 2 - Radiação adaptativa em três estágios dos ciclídeos no Lago Malawi.....14

Figura 3 - Filogenia da família Cichlidae mais recente e completa.....17

Capítulo I

Figura 1: Cariótipos corados em Giemsa dos ciclídeos asiático e africanos estudados neste trabalho, com destaque para cromossomos marcados com sonda de DNAr 18S pela técnica de FISH.....61

Figura 2: Cariótipos corados em Giemsa dos ciclídeos sulamericanos estudados neste trabalho, com destaque para cromossomos marcados com sonda de DNAr 18S pela técnica de FISH.....62

Figura 3: Metáfases de ciclídeos asiático, africanos e sulamericanos marcadas com sonda de DNAr 5S pela técnica de FISH.....64

Figura 4: Dados cariotípicos obtidos neste trabalho plotados numa árvore filogenética baseada nas filogenias propostas por Smith et al. (2008) e por Klett e Meyer(2002).....64

Capítulo II

Figura 1: Cariótipo de *H. obliquidens* corado com Giemsa, nitrato de prata, bandeamento C e marcado por FISH com sonda de DNA enriquecido de sequências repetitivas, de uma biblioteca genômica de *O. niloticus* clonada em BAC.....81

Figura 2: Metáfases de *H. obliquidens* marcado por FISH com sonda de DNAr 5S, DNAr 18S rDNA, após bandeamento C, marcado por FISH com sonda de DNA enriquecido de sequências repetitivas, de uma biblioteca genômica de *O. niloticus* clonada em BACs, d), marcada por FISH com sonda de DNA satellite e DNA com a sequência telomérica (GGGTTA)_n.....82

Figura 3: Metáfases meióticas do testículo de *H. obliquidens* corada por Giemsa, após bandeamento C e marcada com sonda de DNAr 18S.....83

Capítulo III

Figura 1: Cariótipos de *M. lombardoi* corado em Giemsa, nitrato de prata, após bandeamento C e por marcado por FISH com sonda de DNA enriquecido de sequências repetitivas, de uma biblioteca genômica de *O. niloticus* clonada em BACs.....96

Figura 2: Metáfases de *M. lombardoi* após bandeamento C e marcado por marcado por FISH com sonda de DNAr 18S e por sonda de DNA enriquecido de sequências repetitivas, de uma biblioteca genômica de *O. niloticus* clonada em BACs.....97

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1- Relação das espécies de ciclídeos africanos e asiático, localidades das coletas, principais grupos e número de animais analisados neste trabalho.....28

Tabela 2- Relação das espécies de ciclídeos neotropicais, localidades das coletas, tribos e número de animais analisados neste trabalho.....29

Capítulo I

Tabela 1- Ciclídeos asiático e africanos investigados.....57

Tabela 2- Ciclídeos sulamericanos investigados.....57

Capítulo II

Tabela 1- Distribuição do cromossomo B nos indivíduos da espécie *Haplocromis obliquidens* analisados.....79

Capítulo III

Table 1- Distribuição do cromossomo B nos indivíduos da espécie *Metriaclima lombardoi* analisados.....95

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biologia e evolução dos ciclídeos

O grupo dos peixes é o mais antigo, numeroso e diverso dentre os vertebrados. Acredita-se que representem a metade das espécies viventes reconhecidas de vertebrados, com aproximadamente 27.977 espécies válidas para um total de 54.711 (Nelson, 2006), porém este número pode ser ainda maior, pois a cada ano mais e mais espécies são descritas.

A família Cichlidae (do grego, kichle = um tipo de peixe), da subordem Labroidei, possui mais de 3.000 espécies (Kocher 2004, Salzburger e Mayer, 2004) e são os únicos peixes da ordem Perciformes que habitam em água doce ou salobra. Encontram-se distribuídos pela África, ilha de Madagascar, América do Sul e Central, Oriente Médio e Sul da Índia, habitando rios, lagos e lagoas formadas em antigas crateras de vulcão. A maior diversidade de espécies é encontrada principalmente nos grandes lagos do leste da África, Lagos Tanganyika, Malawi e Victoria (Turner et al., 2001; Turner, 2007). Este grupo de peixe tem atraído grande atenção dos pesquisadores devido a sua rápida radiação adaptativa ocorrida nos grandes lagos africanos (Kocher, 2004), ao valor de várias espécies para a aquariofilia e a grande importância de algumas espécies, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), para a aquicultura mundial. Alguns podem suportar condições ambientais extremadas, como é o caso de *Oreochromis alcalicus grahami*, que vive em águas altamente salobras, alcalinas (pH 9,6 a 10,5) e escaldantes nas lagoas periféricas do Lago Magadi, no Quênia (Maina, 2000). Nenhum outro grupo de vertebrados os supera em número de espécies, variedades de forma, coloração e grau de especialização trófica e ecológica (Fryer e Iles, 1972; Coulter, 1991; Meyer,

1993; Stiassny e Meyer 1999; Kornfield e Smith, 2000; Kocher, 2004). Desde a publicação do primeiro relato sobre os ciclídeos do Nordeste da África (citado em Boulenger, 1898), eles têm atraído a atenção dos estudiosos de evolução, sendo frequentemente citados por sua rápida especiação e exuberante diversidade (Liem, 1991; Kocher 2004; Hulsey, 2006).

Análises filogenéticas, baseadas em genes mitocondriais, nucleares e caracteres morfológicos de espécies de ciclídeos representantes das diferentes regiões geográficas, indicam que a família Cichlidae pode ser subdividida em quatro subfamílias: (1) Etroplinae (ciclídeos de Madagascar e sul da Ásia – Índia e Sri Lanka), (2) Ptychochrominae (ciclídeos dos gêneros *Oxylapia*, *Ptychochromis* e *Ptychochromoides* endêmicos da Ilha de Madagascar), (3) Cichlinae (espécies americanas) e (4) Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) (Sparks e Smith, 2004) (Figura 1).

Acredita-se que existam cerca de 1.000 espécies de ciclídeos adaptadas a nichos específicos somente no Lago Malawi (Stiassny, 1991; Kocher, 2004). A tribo Tilapiini, cujas espécies são comumente denominadas de tilápias, inclui os gêneros *Sarotherodon*, *Oreochromis*, *Tilapia* e um quarto gênero, *Danakilia*, que compreende uma única espécie. Cerca de 70 espécies de ciclídeos são referidas como “tilápia”, entre as quais se destaca a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por sua alta capacidade adaptativa a ambientes de diferentes salinidades, o que vem permitindo o seu cultivo também em águas salobras e salgadas (Kubitza, 2005). De acordo com dados das Organizações das Nações Unidas as tilápias, juntamente com outros ciclídeos, tiveram a produção mundial por meio de aquicultura triplicada em dez anos, saltando de 898.308 toneladas produzidas em 1997 para um total de 2.505.465 t em 2007 (FAO, 2009).

Sem contar as espécies introduzidas de ciclídeos africanos no Continente Americano, principalmente a tilápia do Nilo, o número de espécies válidas para a América do Norte, Central e do Sul é de 406 distribuídas em 51 gêneros (Kullander, 1998, 2003). Os ciclídeos neotropicais apresentam uma grande diversidade de formas, comportamento e adaptações relacionadas a vida em diferentes condições ambientais (Lowe-McConnell, 1991). A maioria das espécies habita em ambientes lênticos dentro de rios e córregos, com exceção de algumas espécies reofílicas dos gêneros *Retroculus*, *Crenicichla* e *Teleocichla*. Em relação à alimentação, os ciclídeos neotropicais alimentam-se de uma variedade de invertebrados, peixes e plantas (Lowe-McConnell, 1991; Kullander, 2003).

Entre as espécies de ciclídeos neotropicais destacam-se as espécies dos gêneros *Cichla*, *Astronotus*, *Pterophyllum* e *Symphysodon*. Os tucunarés (*Cichla* spp) e os apaiaris ou oscar (*Astronotus* spp), são popularmente conhecidos em todo o país por serem bastante utilizados para a pesca de subsistência, esportiva e aquicultura. Já os acarás-bandeiras ou angelfish (*Pterophyllum* spp) e os acarás-discos (*Symphysodon* spp) são bastante valorizados na aquariofilia (Goldstein, 1988; Kullander, 2003) devido ao seu pequeno porte e o colorido fascinante (Axelrod, 1996).

Estudos filogenéticos baseados em dados morfológicos e moleculares tem reconhecido a origem monofilética da família, as divergências basais dos taxons da ilha de Madagascar, Índia e Sri Lanka e que os clados africano e sulamericano junto com os citados previamente formam grupos irmãos. As poucas espécies basais existentes são representadas pelas linhagens parafiléticas dos ciclídeos da Índia/Sri Lanka e Madagascar, que são as duas massas continentais que primeiro se separaram do supercontinente de Gondwana entre 165 e 130 milhões de anos atrás.

As Américas são habitadas por cerca de 400-500 espécies porém, o centro de biodiversidade dos ciclídeos se localiza na África oriental, nos Lagos Victoria, Malawi e Tanganika, onde ocorrem cerca de 2000 espécies (Salzburger e Mayer, 2004).

Esse padrão de divergência continental entre os grupos de ciclídeos é bastante consistente com a história geológica da deriva continental a partir do continente de Gondwana e subsequente divergência de espécies, em consequência da ocorrência de vicariância (Figura 1) (Stiassny, 1991; Farias et al., 2000; Sparks e Smith, 2004; Azuma et al., 2008).

Dados geológicos indicam que a separação entre Madagascar e o continente Africano se deu no período do médio Mesozóico (Rabinowitz et al., 1983; Storey et al., 1995). Apesar de serem os grupos mais antigos a divergirem, poucas formas são encontradas nos grupos irmãos de Madagascar e Índia, enquanto que diversas linhagens ocorrem na África e nas Américas, de acordo com dados moleculares e morfológicos (Stiassny, 1991; Streelman e Karl, 1997; Streelman et al., 1998, Farias et al., 1999, 2000; Vences et al., 2001). As linhagens da África e da América do Sul formam juntas um grupo monofilético que é grupo irmão dos táxons da Índia e ilha de Madagascar. Isto está de acordo com a sucessão de eventos de fragmentação de Gondwana: separação do continente Madagascar-Índia da África a 165-121 milhões de anos, separação da África e América do Sul a 101-86 milhões de anos, e separação de Madagascar e Índia a 88-63 milhões de anos (Figura 1) (Rabinowitz et al., 1983; Pitman et al., 1993; Storey et al., 1995; Storey, 1995).

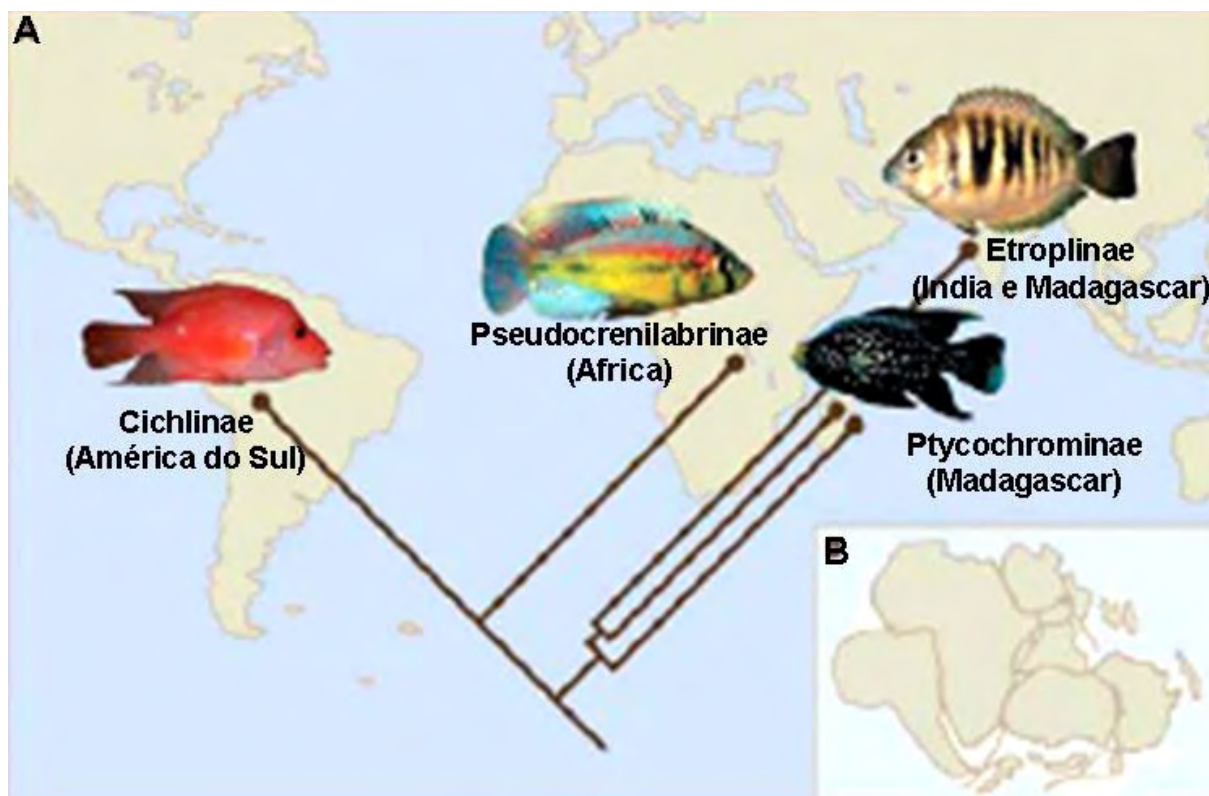


Figura 1: Distribuição das subfamílias de ciclídeos de acordo com a fragmentação do continente de Gondwana (modificado a partir de Salzburger e Meyer, 2004). (A) O padrão de distribuição dos ciclídeos, com os representantes da Índia, Sri Lanka, e Madagascar formando as linhagens mais basais e as linhagens africanas e americanas monofiléticas e grupo irmãos dos outros ciclídeos, é consistente com a distribuição dos continentes de acordo com a deriva a partir de Gondwana. (B) O supercontinente Gondwana cerca de 200 milhões de anos atrás.

Kullander (1998) propôs uma filogenia para a família Cichlidae baseado em 91 caracteres morfológicos de 43 espécies sul-americanas e sete espécies do velho mundo. Nessa filogenia Etroplinae (ciclídeos de Málaga na Índia) e Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) são grupos irmãos e formam um grupo irmão de todos os ciclídeos. Os ciclídeos sulamericanos estavam organizados nas seguintes subfamílias: Retroculinae, Cichlinae, Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae. Subsequentemente uma análise filogenética da família Cichlidae, utilizando se de sequências de DNA mitocondrial, demonstrou que os ciclídeos neotropicais formam um grupo monofilético tendo como grupo basal *Retroculus*. Além disto, apresentam níveis significativamente maiores de variação genética do

que os africanos, apesar do menor número de espécies (Farias et al., 2000). Mais recentemente Smith e colaboradores (2008) propuseram uma nova filogenia, bem mais abrangente e completa, baseada nos genes mitocondriais 16S, COI, Cyt-b, ND4, 4C4 e nucleares H3, M27, S7, RAG2 combinada com análise simultânea de 6.309 caracteres morfológicos para 90 gêneros terminais, incluindo representantes de todas as principais linhagens de ciclídeos e todos os gêneros neotropicais, resultou numa filogenia bem suportada e resolvida até o nível de gênero para os ciclídeos neotropicais (Figura 2); A subfamília neotropical Cichlinae foi recuperada como monofilética e dividida em sete tribos: Astronotini, Chaetobranchini, Cichlasomatini, Cichlini, Geophagini, Heroini, e Retroculini. Chaetobranchini + Geophagini (inclusive os clenicielines) foram resolvidos como grupo irmão de Heroini + Cichlasomatini (inclusive Acaronia). Astronotini foi recuperado como grupo irmão destas quatro tribos. Finalmente um clado composto de Cichlini + Retroculini foi resolvido como grupo irmão para todos os outros cichline. A análise incluiu o fóssil de ciclídeo mais velho conhecido (Eoceno), recentemente descrito, *Proterocara argentina*, sendo que este se posicionou junto com Geophagini, reforçando a origem a partir de Gondwana para Cichlidae (Figura 2, 3) (Smith et al., 2008). Entretanto, os estudos sistemáticos dos ciclídeos neotropicais tem gerado hipóteses tanto de especiação na forma de radiação adaptativa, na forma ecomorfológica (López-Fernández et al., 2005), como de vicariância, resultante das forças geológicas de larga escala, como a captura de cabeceiras e divisão de bacias (Kullander, 1983) como forças geradoras da diversidade no grupo neotropical.

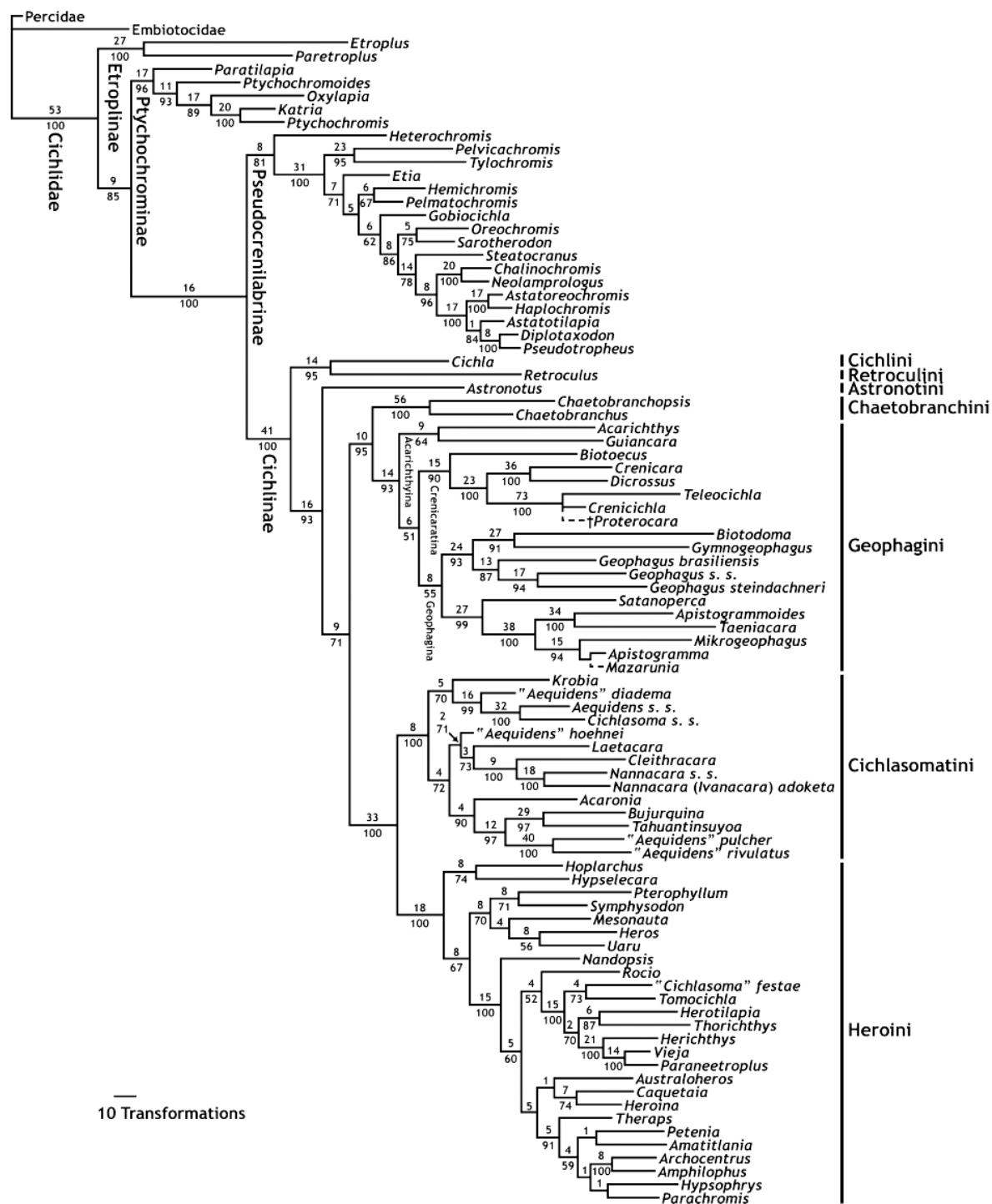


Figura 2: Filogenia da família Cichlidae mais recente e completa obtida a partir de dados morfológicos e de sequências de DNA de nove genes mitocondriais e nucleares (Smith et al., 2008).

Diversos fatores são atribuídos como os responsáveis pela diversidade dos ciclídeos. Um deles tem a ver com sua especialização anatômica. Os ciclídeos possuem dois conjuntos de mandíbulas, uma delas na boca, a qual é usada para sugar, raspar ou arrancar pequenas porções de alimento; a outra é a mandíbula localizada na faringe, a qual é derivada do 5º arco branquial, sendo utilizada para macerar, fatiar e quebrar em pedaços os alimentos ingeridos. A organização peculiar da mandíbula na faringe é uma sinapomorfia compartilhada por todos os ciclídeos (Liem 1973, 1980). Acredita-se que a presença da mandíbula faringeal tenha permitido que a mandíbula oral se tornasse mais especializada para a captura de alimentos (Turner, 2007). As mandíbulas são extremamente versáteis e adaptáveis a ponto de mudarem de forma até mesmo durante o ciclo de vida de um único indivíduo (Meyer 1990a, 1990b). O segundo fator atribuído como responsável pela diversidade dos ciclídeos tem a ver com o comportamento reprodutivo sofisticado e, em particular, com os vários modos de cuidado com a cria (Fryer e Iles, 1972; Goodwin et al., 1998; Kornfield e Smith, 2000; Kocher, 2004). Estudos recentes sugerem que a escolha do parceiro sexual feita pela fêmea, baseada na coloração apresentada pelo macho, também pode desempenhar um papel importante na evolução dos ciclídeos (Seehausen e van Alphen, 1999; Barlow, 2000; Danley e Kocher, 2001). A especiação dos ciclídeos africanos baseada na seleção sexual foi proposta com base em observações feitas em campo (van Oppen et al., 1998), bem como em experimentos de escolha de parceiro em laboratório (Knight et al., 1998; Seehausen et al., 1999). O grupo mais rico em diversidade de espécies da família Cichlidae é formado pelos haplocromíneos. Kocher (2004) sugere que três diferentes estágios de adaptação tenham levado a essa grande diversidade de espécies (Figura 3). Os haplocromíneos também possuem papéis sexuais

fortemente diferenciados, estando todo o cuidado parental restrito às fêmeas, o que provavelmente gerou forte pressão seletiva nas características de corte dos machos. Há também evidências de comunicação por meio de odores e sons quando fazem a corte, e há ainda evidências de que os sinais olfatórios e acústicos podem estar envolvidos no isolamento reprodutivo (Turner, 2007), podendo até mesmo existir espécies crípticas de mesma aparência, mas com sons ou odores diferentes durante o comportamento de corte.

Mas nem toda radiação especiativa de ciclídeos envolve espécies onde houve forte seleção nos caracteres sexuais. Os ciclídeos dos lagos da República de Camarões, como o Lago Barombi Mbo, geralmente apresentam menor especialização no papel sexual e também no dimorfismo sexual, com pouca diferenciação no padrão de coloração entre os sexos na maioria das espécies. O mesmo vale para os ciclídeos que habitam lagos nas crateras de vulcões extintos da Nicarágua e para os lamprologuines, grupo rico em espécies que habitam no interior de conchas vazias, do Lago Tanganika. Para esses grupos, parece mais provável que a especiação se deu por seleção ecológica do que por seleção sexual, o que por sua vez sugere que a divergência dos haplocromíneos foi provavelmente resultante da combinação de ambos os processos (Turner, 2007).

O grupo dos haplocromíneos dos Grandes Lagos Africanos se destacam pela grande variedade de espécies e pelo modo de especiação, com a ocorrência de muitos vivendo em simpatria. Por essas e outras peculiaridades, diversos estudos filogenéticos têm sido a eles direcionados, numa tentativa de entender sua origem e evolução, o que vale a pena ser ressaltado como uma possível base para estudos futuros mais aprofundados da especiação desta família na região neotropical.

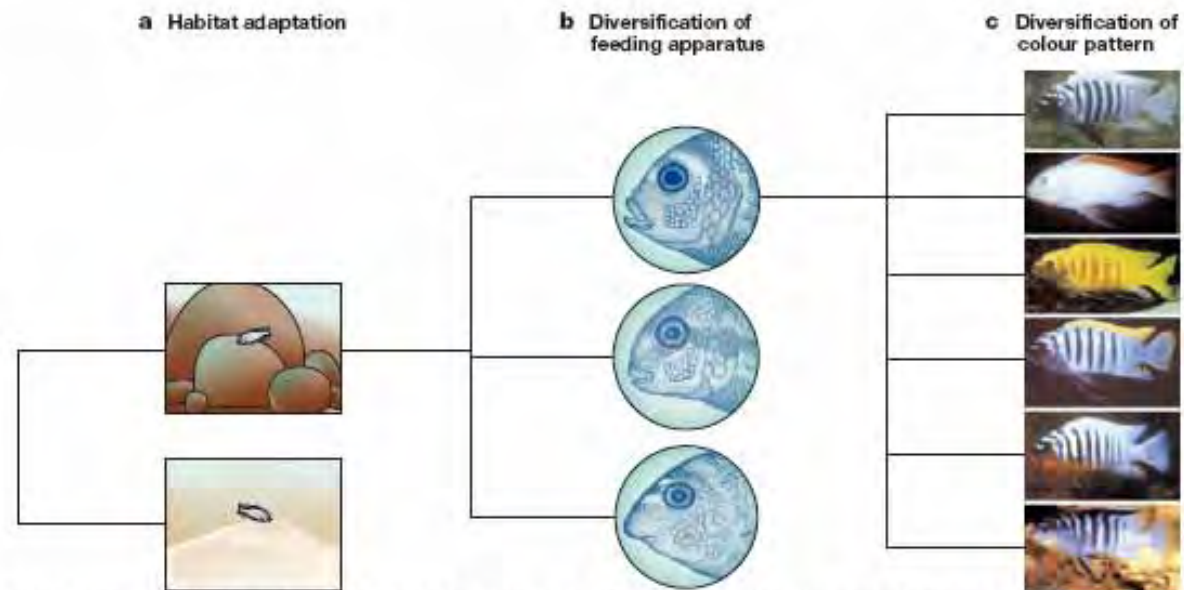


Figura 3. Radiação adaptativa em três estágios dos ciclídeos no Lago Malawi (Kocher, 2004): a) o primeiro estágio envolve adaptação ao habitat rochoso ou arenoso do lago. b) O segundo estágio é diversificação morfológica a diferentes formas de alimentação, representadas pelas mandíbulas de *Metriacroma*, *Tropheus* e *Labiotropheus* (de cima para baixo, respectivamente). c) O terceiro estágio é a diversificação do padrão de coloração do macho dentro de cada linhagem, que estão representadas acima por espécimes do gênero *Metriacroma*.

O Lago Tanganika é o mais velho dos grandes lagos da África oriental com cerca de 9-12 milhões de anos (Cohen et. al, 1993; 1997), seguido pelo Lago Malawi com uma idade estimada de 2-5 milhões de anos (Johnson e Ng'ang'a, 1990; Delvaux, 1995). Ambos possuem a forma de um lago em fenda, bem como se encontram localizados entre as placas tectônicas africanas central e do leste. Eles são relativamente estreitos e extremamente profundos (até ~1.450 m para o Lago Tanganika). O Lago Victoria é o mais jovem dos grandes lagos e é bem mais raso (~80 m de profundidade máxima), tendo sido formado entre 250.000 e 750.000 anos atrás (Johnson et al., 1996). O Lago Victoria possui área similar a Irlanda (cerca de 68.800 km²), e contém 500 ou mais espécies endêmicas de ciclídeos (Seehausen, 1996). O Lago Malawi contém cerca de 500-700 (alguns estimam cerca de 1.000)

espécies de ciclídeos (Turner et al., 2001), enquanto que o Lago Tanganika possui aproximadamente 200-250 espécies de ciclídeos (Snoeks et al., 1994). Estudos realizados para avaliar as relações filogenéticas dos haplocromíneos do Lago Malawi mostram que aparentemente uma explosão especiativa foi seguida por um período de equilíbrio e, mais provavelmente, de extinção de linhagens até que novas explosões especiativas nas quatro linhagens sobreviventes deram origem a moderna diversidade de espécies lá encontrada. Essas explosões especiativas são muito recentes para que se possa detectar variações no DNA mitocondrial (Albertson et al., 1999; Allender et al., 2003). Loh e colaboradores (2008), em trabalho recente, realizaram uma análise computacional comparativa para tentar entender a diversidade desse grupo. Para tanto, partiram de um sequenciamento de baixa cobertura (12-17% do genoma), feito pelo Joint Genome Institute, de cinco ciclídeos do Lago Malawi: *Mchenga conophorus* (anteriormente gênero *Copadichromis*), *Labeotropheus fuelleborni*, *Melanochromis auratus*, *Maylandia zebra*, (anteriormente gênero *Metriacrima*) e *Rhamphochromis esox*. A partir desses genomas foram detectados polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), o quais são bastante utilizados como marcador genético. Com eles foram feitas análises de aproximadamente 70 espécies de ciclídeos que vivem em simpatria no lago. Eles concluíram que os ciclídeos do lago Malawi, apesar da alta diversidade fenotípica, sob o ponto de vista genético aparentam ser uma única população subdividida. A divergência nucleotídica encontrada entre suas espécies foi menor que a encontrada entre linhagens laboratoriais de zebrafish. Concluem que os ciclídeos do Lago Malawi possuem genomas que são mosaicos ancestrais polimórficos, sendo que espécies que divergiram recentemente tem propensão a troca de genes (Won et al., 2005), o que torna os ciclídeos do Malawi um caso complexo e dinâmico de

diversificação evolutiva, onde a recombinação e distribuição de polimorfismos ancestrais podem ser mais importantes do que novas mutações como fonte de variações genéticas. O grupo de espécies do Lago Tanganika aparenta ser oligofilético isto é, algumas poucas linhagens de rios das proximidades provavelmente adentraram o habitat do lago após sua formação e radiaram em paralelo (Salzburger et al., 2002). O padrão de variação genética, estudada através da variação do haplótipo mitocondrial, do principal clado do Lago Victoria difere daqueles padrões observados nos outros lagos do Rift Valley. Existe ausência de alguns haplótipos intermediários, o que poderia estar relacionada à uma extinção em massa, ocorrida entre 15.600 e 14.700 anos atrás (Johnson et al., 1996, 2000), possivelmente devido à dessecação do Lago Victoria. Todavia, os haplótipos encontrados atualmente parecem pertencer a uma radiação ainda mais antiga, entre 98.000 e 132.700 anos atrás, o que claramente contradiz a visão de que o Lago Victoria secou completamente (Nagl et al., 2000). Também foi descoberto por meio desse estudo que os haplocromíneos que colonizaram o Lago Victoria, são originários de um pequeno lago das proximidades, o Lago Kivu. A colonização do Lago Victoria encontra paralelo com a descoberta de que os ciclídeos descendentes do Lago Tanganika colonizou rios e outros lagos de sua bacia. Ambos os lagos, por causa da grande profundidade e consequente estabilidade, parecem ter servido como reservatórios das linhagens de ciclídeos que deram origem aos grupos que hoje habitam os rios e importantes lagos vizinhos (Verheyen et al., 2003).

Contrastando com a especiação predominantemente intralacustrina dos ciclídeos africanos, provavelmente desencadeada por seleção sexual e especialização trófica, a especiação nos ciclídeos Neotropicais ocorreu provavelmente por acúmulo de mutações genéticas em populações alopátricas

vivendo em diferentes rios, porém não associada com grandes divergências no modo de alimentação (Kullander, 1983). Os ciclídeos neotropicais aparentam ter passado por taxas menores de extinção e especiação do que os ciclídeos africanos, preservando assim características primitivas e, portanto, acumulando maiores níveis de divergência genética em algumas dessas linhagens (Farias et al., 1999).

1.2 Citogenética de Cichlidae

Com a aplicação das técnicas convencionais para análise citogenética de peixes como a coloração por Giemsa, nitrato de prata e bandeamento C, inúmeros trabalhos têm sido direcionados à investigação cromossômica destes organismos. Com exceção de alguns estudos de citogenética molecular realizados em *O. niloticus*, os estudos cromossômicos desenvolvidos em diversas espécies de ciclídeos baseiam-se principalmente em análises citogenéticas convencionais.

Os ciclídeos são os peixes mais estudados citogeneticamente dentro da ordem Perciformes. Dentre as 1045 espécies que contém dados cariotipados, 135 são da família Cichlidae (Feldberg et al., 2003). Mesmo assim esse número ainda é pequeno, representando menos de 25% do total de espécies de Perciformes já analisados (Oliveira et al., 2009). Os estudos citogenéticos em ciclídeos foram realizados principalmente a partir de 1975, destacando-se os trabalhos de Oyhenart-Perera e colaboradores (1975), Michele e Takahashi (1977), Kornfield (1978), Thompson (1979), Vervoort (1980) e Feldberg e Bertollo (1985a).

Thompson (1979) obteve informações sobre o cariótipo de 41 espécies de ciclídeos Neotropicais e apresentou através desse trabalho uma interpretação geral sobre a evolução cariotípica desse grupo. Observou que a evolução cromossômica aparenta ter sido um tanto conservativa, com a maioria das espécies analisadas

mantendo o número diplóide ancestral de $2n=48$ cromossomos subtelo-acrocêntricos, os quais teriam dado origem, provavelmente através de inversões pericêntricas, aos cariótipos com maioria dos cromossomos do tipo subtelo-acrocêntricos. Descreve também um segundo padrão cariotípico mais raro, com um maior número de cromossomos metacêntricos que teria evoluído do citado anteriormente por fusão cêntrica. O mesmo autor obteve dados para seis espécies Africanas, havendo encontrado variação no número de cromossomos de $2n=40$ em *Astatotilapia Burtoni* até $2n=46$ em *Melanochromis auratus* (Thompson, 1981).

Majumdar e McAndrew (1986) analisaram os cromossomos de sete tilapiíneos dos gêneros *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, por meio das técnicas de coloração por Giemsa, bandeamento C dos cromossomos mitóticos e também analisaram por meio da coloração por Giemsa os cromossomos meióticos dessas mesmas espécies, tendo encontrando $2n=44$ como número modal para as sete espécies analisadas. Os referidos autores relatam que as diferenças observadas sugerem que ocorreu evolução cariotípica dentro do grupo, mas que havia ainda pouca evidência para suportar o fato de que as mudanças cariotípicas estavam associadas com especiação ou aumento na diversidade genética, sendo difícil estabelecer qualquer concordância entre as diferenças no cariótipo e as análises morfológicas e bioquímicas produzidas para o grupo.

Kornfield (1984) apresentou informações sobre análises cromossômicas de 70 espécies. Feldberg e Bertollo (1985a) analisaram os cariótipos de 10 espécies de ciclídeos embora 5 delas já haviam sido submetidas a estudos citogenéticos. Diversos outros trabalhos seguiram acrescentando novas espécies à lista dos ciclídeos citogeneticamente estudados.

Feldberg e colaboradores (2003) apresentaram uma revisão para toda a família. De acordo com este trabalho 135 espécies de ciclídeos tiveram o cariótipo analisado até então, sendo 29 da África e Ásia e 106 da região Neotropical. De acordo com esse trabalho, os ciclídeos têm sido considerados como um grupo conservado por causa do padrão de cariótipo, sendo possível na época se verificar a manutenção do número diplóide de $2n=48$ cromossomos, principalmente de cromossomos acrocêntricos. Mas apesar de encontrarem $2n=48$ para 60% dos ciclídeos, acreditam que o termo evolução cromossômica conservativa não é apropriado para descrever a real condição desse grupo, pois a ocorrência de diversos rearranjos cromossômicos é bastante clara, como pode ser verificado pela variação no número fundamental (NF). Considerando que $2n=48$ acrocêntricos representa o número diplóide ancestral para a família, isto sugere que a evolução cromossômica nos clados do Velho Mundo ocorreu em duas direções: uma foi a manutenção do número diplóide $2n=48$ e a outra foi o decréscimo a partir deste número, provavelmente por meio de fusão cromossômica devido à presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos em várias espécies (Feldberg et al., 2003).

Por outro lado, a variação cromossômica dos ciclídeos do Novo Mundo é mais pronunciada, com o número diplóide variando entre 38 a 60 cromossomos, com esta variação aparentemente restrita as linhagens das subfamílias Cichlasomatinae e Geophaginae. Com base nesses dados foram sugeridas três direções evolutivas para esse clado: a primeira direção é caracterizada pela manutenção de $2n=48$ cromossomos acrocêntricos, com poucos cromossomos meta-submetacêntricos, possivelmente devido a inversões pericêntricas. Esta tendência evolutiva está presente em espécies das subfamílias Cichlinae,

Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae. A segunda tendência evolutiva inclui um decréscimo no número diplóide em paralelo a um grande número de cromossomos de dois braços (m/sm), sugerindo fusões cromossômicas e inversões pericêntricas. Essa direção foi relatada no gênero *Crenicichla*, Geophaginae e Cichlasomatinae. A terceira direção resulta de um aumento no número diplóide ($2n=50$ e 52), com a manutenção da morfologia dos cromossomos do tipo acrocêntrico, possivelmente devido ao ancestral desse grupo apresentar alguns cromossomos do tipo m/sm originados a partir de inversões pericêntricas, seguidas de fissões centrícas que levaram ao aumento do número diplóide. Esta tendência foi encontrada na subfamília Cichlasomatinae (Feldberg et al., 2003). Ainda dentro desta subfamília se encontra o gênero *Symphysodon*, com poucas espécies, o qual apresenta um cariótipo bastante incomum, com $2n= 60$ cromossomos, com a presença principalmente de cromossomos do tipo m/sm, e também alguns st/a e microcromossomos. Além do mais, há variação no número de sítios de RONS, variando de sítios simples a sítios múltiplos entre as espécies (Mesquita et al., 2008). Também em duas espécies desse gênero, *S. aequifasciatus* e *S. haraldi*, foi relatada a ocorrência da formação de uma grande cadeia cromossômica durante a meiose, com a presença de até 20 elementos, sendo a maior encontrada em vertebrados. A origem desta cadeia seria baseada numa série de translocações envolvendo regiões heterocromáticas de vários cromossomos (Gross et al., 2009). As variações que mantêm o número diplóide dentro da família Cichlidae têm sido atribuídas a mecanismos de rearranjos estruturais principalmente translocações e inversões pericêntricas, enquanto que os mecanismos que modificam o número cromossômico são atribuídos a translocações, fissões e fusões cêntricas (Brum e Galetti Jr., 1997; Fedberg et al., 2003; Mesquita et al., 2008; Gross et al., 2009).

Cromossomos especiais do tipo cromossomos supernumerários e cromossomos sexuais também já foram descritos para os peixes ciclídeos. Para os ciclídeos Neotropicais foi relatada a presença de um a quatro microcromossomos supranumerários, apenas nas células meióticas de testículo, para poucos exemplares de *Gymnogeophagus balzanii*, procedentes do Rio Miranda, MS (Feldberg e Bertollo, 1984). Num relato subsequente, foram encontrados microcromossomos em *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis* and *Crenicichla niederleinii* (Martins-Santos et al., 1995). Em outro estudo, foi relatada a ocorrência de um a três microcromossomos para *Cichla monoculus*, *Cichla* sp e *Crenicichla reticulata*, procedentes dos Lagos Balbina e Catalão da Bacia Amazônica, (Feldberg et al., 2004). Finalmente, em *Laetacara dorsigera* foi relatada a ocorrência de um a dois microcromossomos que teriam se originado de fragmentos cêntricos a partir da fusão de cromossomos acrocêntricos durante o processo de formação dos grandes cromossomos metacêntricos tipicamente encontrados nessa espécie (Martins-Santos et al., 2005). Não existem relatos de cromossomos supernumerários para os ciclídeos africanos.

A presença de cromossomos sexuais em ciclídeos tem sido descrita para alguns ciclídeos, mas ao mesmo tempo tem sido motivo de muita discussão. A espécie *O. niloticus* apresenta cromossomos sexuais do tipo XX/XY (Carrasco et al., 1999), representados pelo par de maior tamanho no complemento. Através da utilização de marcadores moleculares, foram identificados pelo menos quatro locos distintos (grupos de ligação 1, 3, 5 e 7) controlando a determinação sexual, distribuídos em diferentes espécies de ciclídeos africanos que divergiram a mais de 15 milhões de anos. Cnaani e colaboradores (2008) identificaram um sistema de heterogametia masculina (XY) no grupo de ligação 1 (LG1) da tilápia do Nilo, *O.*

niloticus. Por outro lado, foi também identificado entre os tilapiíneos a existência de heterogametia feminina (ZW) com loco de determinação sexual ligado ao LG3. Interessantemente o LG3 de *O. niloticus* (alocado no maior par cromossômico) possui genes de determinação sexual sexual. Porém é o LG1 o grupo que possui os marcadores ligados ao sexo que atualmente foram encontrados segregando entre machos e fêmeas. Dessa forma, acredita-se que nos tilapiíneos o ancestral do clado *Oreochromis* spp. possuía um sistema de determinação sexual com heterogametia feminina com os locos determinantes de sexo alocados no LG3. Os locos alocados no LG1 passaram a tomar o controle da via de determinação sexual em algumas espécies, mudando o mecanismo da via para uma heterogametia masculina. Dessa forma, avanços em citogenética ainda são necessários para um melhor esclarecimento acerca da presença de cromossomos sexuais nos peixes ciclídeos.

Embora estudos citogenéticos tenham sido realizados em um grande número de espécies de ciclídeos, este número não é muito representativo frente à ampla diversidade do grupo. Dessa forma, a expansão das análises citogenéticas, assim como a aplicação de novas tecnologias de análise cromossômica, podem contribuir grandemente para uma melhor compreensão da complexa história evolutiva deste singular grupo de vertebrados. Considerando que algumas espécies de ciclídeos africanos estão com seus genomas em vias de sequenciamento (The International Cichlid Genome Consortium, 2006), os estudos cromossômicos podem contribuir grandemente para uma melhor compreensão do genoma destas espécies. Dessa forma, o mapeamento físico cromossômico de genes e sequências de DNA podem ser integrados a dados de sequenciamento nucleotídico completo de genomas e também a mapas genéticos de ligação, permitindo grande suporte a interpretações acerca da biologia e evolução das espécies.

2. OBJETIVOS

- Realizar análises citogenéticas comparativas entre representantes da família Cichlidae, incluindo espécies asiáticas, africanas e sulamericanas;
- Comparar os dados cromossômicos obtidos às mais recentes filogenias disponíveis para a família, a fim de inferir se a diversificação das espécies do grupo foi acompanhada ou não de mudanças na estrutura cromossômica.
- Identificar a existência de cromossômicos especiais em representantes da família Cichlidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies utilizadas

Foram realizadas preparações cromossômicas de espécimes de ciclídeos do Sul da Índia *Etroplus maculatus*, dos gêneros africanos: *Astatotilapia*, *Aulonocara*, *Cynotilapia*, *Gephyrochromis*, *Haplochromis*, *Hemichromis*, *Labeotropheus*, *Melanochromis*, *Metriaclima*, *Oreochromis*, *Pseudotropheus* e *Tilapia*, e dos gêneros sulamericanos: *Aequidens*, *Astronotus*, *Apistograma*, *Biotodoma*, *Chaetobranchius*, *Cichla*, *Cichlasoma*, *Crenicichla*, *Geophagus*, *Heros*, *Laetacara*, *Mesonauta*, *Parachromis*, *Retroculus*, *Satanoperca*, *Pterophyllum* e *Symphysodon*, sendo que a espécie indiana foi obtida em loja de aquarofilia em Botucatu, SP. Os exemplares de ciclídeos africanos foram obtidos em loja de aquarofilia em Botucatu, SP e também pela colaboração com o Dr. Thomas Kocher, da Universidade de Maryland, USA, que mantém nas instalações de seu laboratório estoques oriundos de coleta no lago Malawi, África, bem como alguns tilapiíneos oriundos de criatórios de New Hampshire (EUA) e Israel, conforme descrito abaixo na Tabela 1. Os ciclídeos sulamericanos foram obtidos em de coletas na natureza em diversas localizações no Brasil e Venezuela, conforme descrito na Tabela 2 abaixo.

Tabela 1: Relação das espécies de ciclídeos africanos e asiático, localidades da coletas, principais grupos e número de animais analisados neste trabalho.

Subfamílias e espécies	Localidades	Principais grupos	No. de animais analisados
Etroplinae			
<i>Etroplus maculatus</i>	Petshop, Botucatu, SP Brasil		03
Pseudocrenilabrinae			
<i>Oreochromis aureus</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		03
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		04
<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio Tietê, Botucatu, SP, Brasil; CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil Instituto de Aquicultura, Universidade de Stirling, Escócia; Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA	tilapiíneos	22
<i>Oreochromis tanganycae</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		01
<i>Tilapia mariae</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		02
<i>Tilapia mamfe</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		01
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil	hemicromíneos	01
<i>Astatotilapia burtoni</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		03
<i>Aulonocara baenschi</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		03
<i>Cynotilapia afra</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		01
<i>Gephyrochromis moorii</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		03
<i>Haplochromis livingstonii</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		01
<i>Haplochromis obliquidens</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		01
<i>Labeotropheus trewavase</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA; Petshop, Botucatu, SP, Brasil	haplocromíneos	01
<i>Melanochromis auratus</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA; Petshop, Botucatu, SP, Brasil		02
<i>Metriaclima barlowi</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		06
<i>Metriaclima gold zebra</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		04
<i>Metriaclima lombardoi</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA; Petshop, Botucatu, SP, Brasil		22
<i>Metriaclima pyrrsonotus</i>	Instalação de Aquicultura Tropical, UMD, USA		08
<i>Pseudotropheus tropheops</i>	Petshop, Botucatu, SP Brasil		01
<i>Pseudotropheus zebra</i>	Petshop, Botucatu, SP Brasil		01
<i>Pseudotropheus sp</i>	Petshop, Botucatu, SP Brasil		01

Tabela 2: Relação dos ciclídeos sulamericanos, localidades das coletas, tribos as quais pertencem e número de animais analisados neste trabalho.

Espécies	Localidades	Tribos	No. de animais analisados
<i>Cichla temensis</i>	Rio Tocantins, Tucuruí, TO, Brasil	Cichlini	17
<i>Cichla orinocensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela		01
<i>Cichla piquiti</i>	Rio Araguaia, São Felix do Araguaia, MT, Brasil		04
<i>Cichla kelberi</i>	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil Rio Tietê, Bariri, SP, Brasil		12
<i>Retroculus lapidifer</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil	Retroculini	02
<i>Astronotus ocellatus</i>	Rio Tietê, Barra Bonita, SP, Brasil	Astronotini	09
<i>Chaetobranchus flavescens</i>	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil	Chaetobranchini	01
<i>Apistogramma borelli</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS, Brasil	Geophagini	05
<i>Biotodoma cupido</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil		07
	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil		
<i>Crenicichla lepidota</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS, Brasil		05
<i>Crenicichla strigata</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças and São Félix do Araguaia, MT, Brasil		03
<i>Crenicichla britskii</i>	Córrego Olaria, Poloni, SP, Brasil		01
<i>Crenicichla aff britskii</i>	Córrego Olaria, Poloni, SP, Brasil		01
<i>Crenicichla aff haroldoi</i>	Córrego Olaria, Poloni, SP, Brasil		01

<i>Geophagus brasiliensis</i>	Córrego Olaria , Poloni, SP, Brasil		07
	Córrego Araquá, Botucatu, SP, Brasil		
	Rio Bonito, Barra Bonita, SP, Brasil		
	Rio Paraitinguinha, Salesópolis, SP, Brasil		
<i>Geophagus proximus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil	Geophagini	04
<i>Geophagus cf proximus</i>	Rio Tietê, Buritama, SP, Brasil		04
	Rio Engenheiro Taveira, Araçatuba, SP, Brasil		
<i>Geophagus surinamensis</i>	Rio Orinoco, Caicara, Venezuela		03
<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil		16
	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil		
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Lagoa Comprida, Aquidauana, MS, Brasil		09
<i>Aequidens tetramerus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil		09
	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil		
<i>Cichlasoma facetum</i>	Córrego Campo Novo, Bauru, SP, Brasil		06
	Rio Paraitinguinha, Salesópolis, SP, Brasil	Cichlasomatini	
<i>Cichlasoma nigrofasciatum</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		13
<i>Cichlasoma paranaense</i>	Córrego Carrapato, Penápolis, SP, Brasil		08
	Córrego Batata, Miracatú, SP, Brasil		
	Córrego Faú, Miracatú, SP, Brasil		
<i>Laetacara dorsigera</i>	Rio Bahia, Pracinha, PR, Brasil		01
<i>Heros efasciatus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil		03
	Rio Araguaia, São Félix do Araguaia, MT, Brasil		
<i>Mesonauta festivus</i>	Rio Araguaia, Barra do Garças, MT, Brasil		10
	Rio Araguaia, São Félix Araguaia, MT, Brasil	Heroini	
<i>Parachromis managuensis</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		01
<i>Pterophyllum scalare</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		04
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brasil		02

3.2 Metodologia

3.2.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos por preparações diretas

As preparações metafásicas foram obtidas seguindo a metodologia adaptada para peixes por Bertollo et al. (1978), conforme a seguir: foi injetada intraperitonealmente colchicina 0,025% na proporção de 0,5 ml para cada 100 g de peso do animal. Em seguida o peixe foi deixado em aquário bem aerado por 40 minutos. Após o animal ser anestesiado e sacrificado com uma dose letal de benzocaína, seguida por transecção espinhal (protocolo 01204 do Comitê de Ética em Experimentação Animal, UNESP, SP), foi retirada a porção anterior do rim, sendo a mesma colocada em 7 ml solução hipotônica de KCl 0,075 M, tendo sido o tecido divulsionado com o auxílio de uma seringa de vidro. Em seguida foi retirado o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de centrifuga de 15 ml. Após a suspensão celular ser incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos, a mesma foi pré-fixada com 10 gotas de fixador metanol:ácido acético (3:1) e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado fixador até dobrar o volume, sendo então pipetado por 100 vezes para depois ser centrifugado por 10 minutos a 800 rpm. Após o sobrenadante ser descartado, o pelet foi ressuspensionado em 7 ml de fixador e pipetado por mais 100 vezes e, em seguida, o mesmo foi centrifugado por 7 minutos a 1000 rpm, tendo sido repetida essa lavagem por mais duas ou três vezes. Após a última lavagem, o material foi ressuspensionado com fixador de forma que este se apresentasse um pouco turvo. Em seguida a suspensão foi pingada em lâminas de vidro que estavam previamente submersas em H₂O destilada, aquecidas em banho-maria a 60 °C. Os cromossomos foram analisados em um fotomicroscópio Olympus BX61. As imagens

foram capturadas por uma câmera digital Olympus DP70 em campo claro, por meio do programa Image-Pro® Plus Version 6.0 for Windows e processadas no programa Adobe Photoshop 7.0.1.

Os cromossomos foram organizados em pares de homólogos de acordo com a razão (r) entre os braços estabelecida por Levan et al. (1964) em dois grupos: meta-submetacêntricos ($m-sm$, $1 \leq r \leq 3$) e subtelo-acrocêntrico, ($st-a$, $r \geq 3$) e organizados em ordem decrescente de tamanho. Aqueles em que a razão entre os braços era 3, foi colocado em um dos grupos de acordo com a decisão do observador, como feito anteriormente em outro estudo (Thompson, 1979).

3.2.2 Obtenção de cromossomos meióticos

Os cromossomos meióticos foram obtidos pela técnica descrita por Kligerman e Bloom (1977) com adaptações, conforme segue adiante. Foram injetados 0,5 ml de colchicina 0,025 % para cada 100 g de peso do animal, 40 minutos antes do mesmo ser sacrificado. Em seguida foram retirados os testículos e cortados em pequenos pedaços dentro de 7 ml de solução hipotônica de KCl 0,075M, após, foram deixados em temperatura ambiente por 30 minutos. Então foi dobrado o volume com fixador metanol:ácido acético (3:1) e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, a 4 °C. Em seguida foi descartado o sobrenadante e completado com 5 ml de metanol/ácido acético 3:1 e centrifugado novamente. Foi repetido o procedimento anterior por mais duas vezes a partir do descarte do sobrenadante. Após, foi transferido um pequeno pedaço do testículo para uma lâmina escavada com duas gotas de ácido acético 50%. Em seguida o material foi fragmentado com duas agulhas até obter uma suspensão celular. Após, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi pingada uma gota sobre uma lâmina aquecida a 50 °C e reaspirada

imediatamente. O procedimento foi repetido em mais dois ou três campos da lâmina. Em seguida foi seca e corada com solução de Giemsa 5%, por 7 minutos.

3.2.3 Detecção de Heterocromatina Constitutiva (Bandeamento C)

A fim de evidenciar a presença de heterocromatina constitutiva, foi utilizado o método descrito por Sumner (1972), com adaptações, conforme segue: a preparação cromossômica foi pingada em lâmina de vidro e seca por 8 horas em estufa a 37 °C. Em seguida a lâmina foi mergulhada em HCl 0,2 N em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após, foi enxaguada em água destilada e mergulhada em solução de Bário a 5%, a 60 °C, por 7 a 20 segundos, dependendo da espécie. Em seguida foi mergulhada em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavada com água destilada. Após, a lâmina foi colocada em solução salina 2×SSC, a 60 °C, durante 30 minutos e depois enxaguada com água destilada e seca ao ar. Finalmente foi corada com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 15 minutos.

3.2.4 Detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos: Ag-RONs

A localização das regiões organizadoras de nucléolos foi feita pela técnica de Howell e Black (1980) conforme descrita adiante. Foram pingadas sobre as preparações cromossômicas duas gotas de solução de gelatina 1% e quatro gotas de nitrato de prata 50%. Em seguida foi misturado levemente e coberto com lamínula 60×20 mm. Após, foi colocado sobre um suporte em banho-maria a 60 °C, durante o tempo necessário para que os nucléolos adquirissem uma coloração quase preta, em geral por 2 a 3 minutos. Em seguida foi removida a lamínula com um jato de água destilada e a lâmina foi seca ao ar. Finalmente o material foi corado com solução de Giemsa 1% por 1 minuto, lavado em água corrente e seco ao ar.

3.2.5 Hibridação *in situ* fluorescente – FISH

O protocolo descrito a seguir foi baseado nos procedimentos adotados por Pinkel e colaboradores (1986) com adaptações apresentadas por Martins e Galetti Jr. (2001).

Tratamento das lâminas:

As lâminas podem ser preparadas com os cromossomos pingados com um dia de antecedência ou no momento do uso. Cada lâmina foi tratada com 100µl de RNase 40 µg/ml (0,4µl de RNase 10 mg/ml e 99,6 µl de 2×SSC) por 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes em 2×SSC durante 10 minutos . Após, foram desidratadas em etanol gelado, em concentração de 70%, 85% e 100%, durante 10 minutos cada. Após, as lâminas foram mergulhadas em formamida 70%, 2×SSC, por 5 minutos a 70°C. Em seguida o material foi novamente desidratado em etanol gelado em concentração de 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada e deixado secar ao ar.

Preparação das Sondas

Foram utilizados como sondas nos experimentos de FISH clones plasmidiais contendo o gene ribossomal 18S isolado do genoma da tilápia do Nilo, com os primers 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT) e 18Sr (5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA), desenhados a partir das sequências do catfish *Ictalurus punctatus*, os quais amplificam um segmento de aproximadamente 1.400 pares de base do gene RNAr 18S (Teixeira et al., 2009). O gene ribossomal 5S foi isolado com os primers 5Sf (5'- TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5Sr (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC), os quais amplificam o gene do DNAr 5S completo

(Martins and Galetti Jr., 1999). Também foram usadas como sondas as sequências repetitivas de uma biblioteca genômica de *O. niloticus* isoladas em BACs. Estas sequências foram marcadas com biotina por *nick translation* de acordo com instruções do fabricante (*BioNick labelling system*, Invitrogen).

Solução de hibridação:

No tubo de 1,5 ml com a sonda eluída em 6µl de água ultra pura, foram adicionados 40µl de formamida (concentração final de 50 %), 16µl de sulfato dextrano 50% (concentração final de 10%) e 8µl de 20×SSC (concentração final 2×SSC). Em seguida foi levado ao banho fervente por 10 minutos e imediatamente foi colocado sobre gelo.

Hibridação:

Foram colocados 80µl da solução de hibridação nas lamínulas e, em seguida, foi coberto com as lâminas. As lâminas com o material voltado para baixo foram mantidas em câmara úmida (2×SSC) a 37°C, por 24 horas.

Lavagens:

As lâminas foram lavadas em 2×SSC em temperatura ambiente, apenas para retirar a lamínula, deixadas escorrer bem, sem contudo secar. Em seguida foram lavadas em formamida 50% por 15 minutos a 37°C, depois em 2×SSC por 15 minutos a 37°C, após foram lavadas em 2×SSC, por 15 minutos, em temperatura ambiente e finalmente em 4×SSC em temperatura ambiente, por 15 minutos.

Deteccção:

Sobre cada lâmina foram colocados 70 µl de avidina-FITC 0,07% em tampão C (0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15 M de NaCl). Em seguida foram cobertas com lamínula e deixadas por 40 minutos a 1 hora, em câmara umidificada com 2×SSC. Após, as lâminas foram lavadas em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1,26 %, leite em pó desnatado 1%, citrato de sódio 0,018 % e Triton 0,0386 %, água destilada, pH 8,0) recém-preparado a 42°C por 5 minutos, por 3 vezes, com agitação. Após, sobre cada lâmina foram colocados 80µl de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2µl de anti-avidina estoque em 78µl de tampão de bloqueio), tendo sido cobertas com lamínulas e deixadas hibridando em câmara umidificada com 2×SSC, a 37°C por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão de bloqueio por 3 vezes (5 minutos cada) sendo em seguida aplicado o FITC. Ao final do tratamento com FITC, as lâminas foram lavadas no tampão de bloqueio por 3 vezes, por 5 minutos, com agitação. Em seguida foram lavadas em 4×SSC/Triton 2% por duas vezes (3 minutos cada com agitação) e mais duas vezes em 4×SSC/Triton 0,2 %. Finalmente foram secas ao ar.

Montagem das lâminas:

As lâminas receberam solução de iodeto de propídio na proporção de 25 µl de *antifading* para 1µl de solução de iodeto de propídio (50µg/ml) por lâmina e foram cobertas com lamínula.

Processamento das imagens

Os cromossomos metafásicos e meióticos foram analisados em um fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX61. As imagens foram capturadas com

uma câmera digital Olympus DP70, com o auxílio do programa Image-Pro® Plus Version 6.0 for Windows e processadas no programa Adobe Photoshop 7.0.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Capítulo I:

Chromosome evolution in Cichlidae fishes

Abstract

Karyotypes of one Asian, 22 African, and 30 South American cichlid species were investigated to address the understanding of chromosome evolution in the group. We found karyotype formulae varying from $2n=40$ to $2n=60$ chromosomes. The karyotype diversification of cichlids seems to have been occurred through several chromosomal rearrangements involving fissions, fusions and inversions. Although different events of chromosomal rearrangements have acted during the chromosome evolution in the family, it was possible to identify karyotype characteristics of the major groups. It seems that particular events of chromosomal rearrangements could be favored due the intrinsic genomic content of specific chromosomal elements involved.

Keywords: cytogenetics, Cichlidae, evolution, fish, genome

Abbreviations:

$2n$ = diploid number of chromosomes

FISH= fluorescence in situ hybridization

FN= fundamental number of chromosome arms

KF= karyotype formula

m= metacentric

m/sm= metacentric/submetacentric

st/a= subtelocentric/acrocentric

mi= microchromosome

Introduction

Teleost fishes have been spectacularly successful over the past 200 million years. The 23,000 species of teleosts make up almost half of all living vertebrates (Helfman et al., 1997). Perciformes represents the largest order of vertebrates with approximately 9,300 species and includes more than 3,000 species of the family Cichlidae (Helfman et al., 1997; Salzburger and Meyer, 2004) that is one of the most species-rich families of vertebrates (Nelson, 2006). The natural distribution of the cichlid fishes is centered on Africa, Latin America and Madagascar, with only a few species native to South India and Middle East (Genner et al., 2007). Mitochondrial genome sequences indicate that cichlids are closely related to the marine surfperches (Embiotocidae) and damselfishes (Pomacentridae), but not as previously thought, to wrasse and parrotfishes (Labridae and related families) (Turner, 2007). Phylogenetic reconstructions are consistent with cichlid origins prior to Gondwanan landmass fragmentation 121–165 MYA, considerably earlier than the first known cichlid fossils from Eocene (Genner et al., 2007). Cichlid fishes found in the lakes of Africa have served as model systems for the study of evolution. These organisms represent a model of evolution in progress because the great number of species (1,000 in Lake Malawi alone), the enormous diversity of trophic adaptations and behaviors, and the extreme rapidity of their divergence (<50,000 years for some faunas). Because these fishes are confined to distinct lacustrine environments and their origin is bounded by geological features, these groups provide models to study evolution (Kornfield and Smith, 2000). In fact, they constitute a classical example of adaptive radiations and rapid speciation which has led to an extensive ecological diversity (Genner and Turner, 2005; Kocher, 2004). Besides their astonishing evolutionary history, several cichlid species are of great importance to tropical and

subtropical aquaculture and have received increasing scientific attention (Pullin, 1991).

The family Cichlidae represents a monophyletic group and the limits and interrelationships of all four subfamilies Etroplinae (Indian and Madagascar), Ptychochrominae (Malagasy), Cichlinae (Neotropical region) and Pseudocrenilabrinae (African) are well supported by molecular and morphological data (Sparks and Smith, 2004). The African (Pseudocrenilabrinae) and Neotropical (Cichlinae) cichlids are both monophyletic and represent sister groups (Sparks and Smith, 2004). The African Pseudocrenilabrinae cichlids are often distributed into pelmatochromine, haplochromine and tilapiine groups (Lowe-McConnell 1991), but these groups are not recognized as valid taxonomic units. The Neotropical cichlids (Cichlinae) are monophyletic and are composed of 51 genera and 406 described species (Kullander 1998, 2003). The most recently proposed phylogeny of the group denotes the tribes Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini and Heroini as part of the Cichlinae clade (Smith et al., 2008).

From the cytogenetic point of view the teleost fishes have a great variety of numbers of chromosomes, ranging from 14 up to 140, with the modal number around $2n=48$, without the presence of microchromosomes in the standard complement. The karyotypes of teleosts also present a great variety of chromosomal formulae with different amounts of metacentric, submetacentric, subtelocentric and acrocentric chromosomes. Comparative cytogenetic analyses have demonstrated a conservation of the diploid number of chromosomes in Perciformes with great frequency of $2n=48$ acrocentric chromosomes, with fundamental number of arms (FN) equals to 48. Such karyotype formulae is thought to be the ancestral karyotype configuration for Perciformes (Brum and Galetti Jr., 1997).

The karyotypic formulae of 135 species of cichlids have been determined (Feldberg et al., 2003). Although more than 60% of the species present a karyotype with $2n=48$, the diploid number ranges from $2n=32$ to $2n=60$, (Feldberg et al., 2003, for review). African cichlids have a modal diploid number of 44 chromosomes whereas the Neotropical cichlids $2n=48$ chromosomes (Feldberg et al., 2003). The genomes of several African cichlid species will soon be sequenced (The international cichlid genome consortium, 2006), so it is therefore of particular interest to investigate the chromosome structure of some representative taxa of the group.

The aim of this work was to compare the chromosome data and the phylogenies obtained by molecular and morphological analysis, correlating chromosomal rearrangements with particular phylogenetic transformations during the evolutionary history of the Cichlidae family. In this way, one Asian, 22 African and 30 South American cichlid species (a total of 264 individuals) were cytogenetically analyzed, and for better characterization of karyotypes some representative species had their chromosomes probed with 5S and 18S RNA genes through fluorescence in situ hybridization (FISH).

Materials and Methods

Specimens and chromosome preparation

In the present work were analyzed one species of South Indian cichlid obtained from commercial source, 30 South American cichlid species that were collected in several South American hydrographic systems, and 22 species of African cichlids, some obtained from commercial source and some from wild stocks (mainly from the Lake Malawi, Africa) maintained at the Tropical Aquaculture Facility of University of Maryland, USA (Table 1 and 2). The fishes were euthanized with a lethal dose of

benzocaine followed by spinal transection (Protocol 01204 – Committee of Ethical in Animal Experimentation – UNESP – São Paulo State University, Brazil) before removal of kidneys for chromosome preparation.

Mitotic chromosome preparations were obtained from kidney according to Bertollo et al., (1978). In attempt to obtain a larger number of metaphases of good quality, animals were injected with a bread yeast solution 12-24 hours prior the dissection. Animals were treated with a 0.025 % solution of colchicine (1 ml/100 g weigh body) 40 minutes before euthanasia and chromosome preparation. The kidney tissues were dissected and the cells dissociated with the use of a syringe in a hypotonic solution of KCl 0.075 % and kept in this solution for 30 to 50 min. The cells were fixed in 3:1 methanol–acetic acid and used to prepare slides that were stained with Giemsa solution 5 % in phosphate buffer at pH 7 for 10 min.

Fluorescence *in situ* hybridization

Ribosomal RNA (rRNA) genes (18S and 5S) were isolated via PCR (Polymerase Chain Reaction) from the genome of *O. niloticus* and used as probes for fluorescence *in situ* chromosome hybridization (FISH). Copies of the 18S rRNA gene were amplified with the primers 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT) and 18Sr (5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA), which were designed based upon the sequence of the catfish *Ictalurus punctatus* (GenBank accession number AF021880) to amplify an approximately 1,400 base pairs (bp) DNA segment of the 18S rRNA gene. The 5S rRNA genes were isolated with the primers 5Sf (5'- TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) and 5Sr (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC), which were designed from the 5S rRNA gene sequence from *Salmo gairdnerii* (Komiya and

Takemura, 1979) to amplify complete repeats of 5S rDNA (Martins and Galetti Jr., 1999).

Mitotic chromosomes were subjected to FISH (Pinkel et al., 1986) using the PCR products from the 5S and 18S rRNA genes as probes. The probes were labeled by nick translation with biotin-14-dATP. The metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 µg/ml) for 1.5 h at 37 °C. Next, the chromosomal DNA was denatured in 70 % formamide, 2x SSC for 4 min at 70 °C. The hybridization mixtures, which contained 100 ng of the denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2x SSC and 50 % formamide in a final volume of 30 µl, were dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a 2x SSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 37 °C in 2x SSC, 50 % formamide for 15 min, followed by a second wash in 2x SSC for 15 min and a final wash at room temperature in 4x SSC for 15 min. Detection of the biotin labeled probe was carried out with Avidin-FITC (Sigma). Chromosomes were counterstained with propidium iodide (0.2 %) diluted in antifade (Vector).

Chromosome analysis

The chromosome spreads were analyzed using an Olympus BX 61 microscope, and the images were captured with the Olympus DP70 digital camera with the software Image-Pro MC 6.0. Karyotypes were arranged in order of decreasing chromosome size and the chromosomes classified as meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocentrics (st/a) according to the arms ratio of Levan et al. (1964). The FN was calculated taking into account the st/a and the m/sm chromosomes with one and two arms, respectively.

Results and Discussion

Conventional cytogenetic analysis

Subfamily Etroplinae

The karyotype of *Etroplus maculatus* consists of 46 chromosomes including nine m/sm and 14 st/a pairs (Table 1, Figure 1). The most remarkable characteristic of *E. maculatus* karyotype was the presence of two outstanding large metacentric pairs, and five pairs of microchromosomes. This karyotype represents a derived condition when compared to the Perciformes basal karyotype (2n=48 acrocentric chromosomes) (Brum and Galetti Jr., 1997) as well as in relation to the karyotype of other cichlids (Figure 6).

The etropline cichlids are quite morphologically distinct, exhibiting numerous specializations that are absent in all other cichlid lineages (Cichocki, 1976). The subfamily Etroplinae was the first group to be isolated from the ancient cichlid group that was present in the Gondwanan supercontinent (Sparks and Smith, 2004) and, the longest time of vicariance speciation could account for the transformation shown by such a derived karyotype.

Subfamily Pseudocrenilabrinae

Tilapiine group

The fishes named “tilapias” include more than 70 species that represent a significant proportion of the fish fauna of the African Great Lakes. These species are commonly divided into three genera: the substrate spawning *Tilapia* species, the biparental/paternal mouthbrooding *Sarotherodon*, and the maternal mouthbrooding *Oreochromis* species (Trewavas, 1983). In this work we sampled *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus*, *O. tangericae*, *Tilapia mamfe* and *T. mariae*

(Figure 1, Table 1). Only a limited number of the known tilapia species have been karyotyped, with the existing evidence suggesting that the tilapia karyotype is highly conserved (Majumdar and McAndrew, 1986; Klinkhardt et al., 1995) and that the species are closely related (Nagl et al., 2000).

The karyotypic formulae of tilapiines investigated here are relatively conserved with $2n=44$ chromosomes for most species (Table 1, Figure 1). Small differences related to variations in the number of m/sm and st/a chromosomes are frequent and some species exhibit remarkable variation in their karyotypes related to the occurrence of specific chromosome rearrangements that took place during their evolutionary history. To date, only four species have their karyotypes differing from $2n=44$, *T. mariae*, $2n=40$ (Thompson, 1981), *T. sparrmanii*, $2n=42$; (Thompson, 1981), *O. alcalicus*, $2n=48$, (Post, 1965; Denton, 1973; Park, 1974) and *O. karongae*, $2n=38$ (Harvey et al., 2002). The reduction of chromosome number in some species and the origin of the largest typical chromosome pair outstand the most remarkable characteristic of tilapiine karyotypes. The karyotype of *O. karongae* shows a reduced diploid number of chromosome to $2n=38$ and differs from that found in most tilapia species. Meiotic analysis previously done point to the reduction of chromosome number in *O. karongae* as a consequence of chromosome fusions involving three chromosome pairs in the ancestral of this species (Harvey et al., 2002). Chromosome fusions are also believed to have occurred to originate the largest chromosome pair of *O. niloticus* (Chew et al., 2002). This kind of chromosome rearrangement could also explain the reduction in the number of chromosomes i *T. mariae*, which was karyotyped in the present work and shows a reduction to 40 chromosomes (Figure 1, Table 1). The presence of two atypical metacentric chromosome pairs (pairs 1 and 2) in *T. mariae* (Figure 1) suggests that these

chromosomes originate from the fusion of small st/a chromosomes. These data support the hypothesis that chromosomal fusions occurred independently during the evolutionary history of tilapiines reducing the chromosome number from $2n=44$ as observed in several tilapia species.

Haplochromine group

Most of the haplochromine species we analyzed had a karyotypic formulae composed of $2n=44$, with $KF=58$, with variation of KF between 54 to 58 in few species (Figure 1, Table 1). *Astatotilapia burtoni* had a karyotype of $2n=40$, with 14 m/sm and 26 st/a chromosomes (Figure 1, Table 1). The difference is in the second and third metacentric chromosome pair, which probably are the result of centric fusion of four small st/a chromosome pairs into two pairs in *A. burtoni*. This transformation apparently occurred after the divergence of *Astatotilapia* from the other haplochromines.

The recent phylogenetic divergence of haplochromine species (Loh et al., 2008) is also depicted by their collective karyotypic formulae. This common karyotype, shared by most of all the haplochromine species, was probably present in the ancestor of the group.

Hemichromine group

The karyotype of *Hemichromis* when compared to haplochromines and tilapiines shows a less derived condition because of the fewer number of m/sm chromosomes (two chromosome pairs), but keeps the same diploid number (Figure 1, Table 1).

Subfamily Cichlinae

Astronotini, Cichlini and Retroculini

The karyotype of *Cichla kelberi* (Figure 2, Table 2) shows the most similar characteristics of the supposed ancestral karyotype of Perciformes represented by $2n=48$ acrocentric chromosomes. In the phylogenetic analysis of Smith and colleagues (2008) a clade composed of Cichlini and Retroculini was recovered as the sister group to all other cichlins. The karyotype of *Retroculus lapidifer* shows three pairs of m/sm chromosomes that is a derived condition and it is in agreement to the extension of the branches in the phylogenetic tree, where *Retroculus* occupies a longer branch than *Cichla*, what indicates a higher number of transformations.

Astronotus was recovered as a sister group to all other cichlins (less *Cichla* and *Retroculus*) and in a separated clade from Chaetobranchini (Smith et al., 2008) with which has historically been allied on the basis of morphological evidence (Regan, 1906; Cichocki, 1976; Stiassny, 1991; Casciotta and Arratia, 1993; Kullander, 1998). But when both karyotypes are compared *Chaetobranchius* shows a less derived karyotype with 6 m/sm chromosomes while *Astronotus* has 12 m/sm chromosomes (Figure 2) and that is in accordance with the previous cited phylogeny.

The karyotype formula $2n=48$ st/a elements is characteristic of Perciformes, as observed in Sciaenidae (Feldberg et al., 1999; Accioly and Molina, 2008), Pomacentridae (Molina and Galetti Jr., 2002) and Haemulidae (Nirchio et al., 2007). Such data suggest that $2n=48$ st/a identified in *Cichla* retains the ancestral karyotype pattern of the group. The ancestral karyotype could have undergone major changes in its macro-structure, which could have led to the extensive karyotype diversification that is currently observed among cichlids. Such an observation is consistent with

several proposed phylogenies for the family (Smith et al., 2008), which generally include the genus *Cichla* in the most basal clade of the group.

Geophagini

The tribe Chaetobranchini was recovered as sister group to Geophagini (Smith et al., 2008) as previously found in molecular and morphological analyses that included chaetobranchins and geophagins (Farias et al., 2000, 2001; Sparks and Smith, 2004). In agreement to the previous phylogenetic analysis *Chaetobranchus* has a fundamental number of arms (FN=54) (Table 2), similar to species of *Crenicichla* genus. The genus *Crenicichla* is the only karyotype sample of the subtribe Crenicarathyina and it has a FN=54 what differentiates it from the members of the subtribe Geophagina. This subtribe is composed by the genus *Geophagus*, recovered as monophyletic and sister group to *Biotodoma* and *Gymnogeophagus*, and the clade composed by these three last genera was recovered as the sister group to *Satanoperca* and the “dwarf cichlids” *Apistogramma*, *Apistogrammoides*, *Mazarunia*, *Mikrogeophagus* and *Taeniacara* (Smith et al., 2008). In the present work the karyotypes of *Biotodoma*, *Geophagus* and *Satanoperca* were found to have the same number of chromosomes ($2n=48$) and the same FN=52, which is in accordance with the presence of *Biotodoma* and *Geophagus* in the same clade but in disagreement with the separation of *Satanoperca* in a paraphyletic group. Conversely, the karyotype of *Apistogramma borelli*, when compared to the basal karyotype of cichlids, shows the most derived condition of this tribe, because of the reduced number of chromosomes ($2n=46$), and the presence of eight m/sm chromosome pairs. Probably the symmetric meta/submetacentric third chromosome pair could be the result of a centric fusion of two acrocentric chromosome pair and

therefore account for the reduction of the total number of chromosomes for *A. borelli* (Figure 2e).

Cichlasomatini

The cytogenetic data obtained allow the differentiation of Cichlasomatini in relation to the genera *Aequidens* and *Cichlasoma*, recovered as a monophyletic clade by Smith and colleagues (2008), because of the higher FN found in *Aequidens* species (FN=60). Compared to the previous genus, *Cichlasoma* (FN=54 and 56) showed lower FN what could represent a less derived condition. Undoubtedly *Laetacara dorsigera* shows the most derived karyotype with different number of chromosomes $2n=44$, and two outstanding large metacentric chromosomes, that could possibly be the result of a Robertsonian fusion of four acrocentric chromosomes (Figure 2k). This characteristic is in accordance to the separation of this species in a different branch from the others genera (Smith et al., 2008).

Heroini

Heroini is the Neotropical tribe that showed the broadest range of transformations in the evolution of karyotypes. The cichlid *Parachromis managuensis* was karyotyped and it has the most basal characteristic because of the number of chromosomes ($2n=48$) and for the number of arms (FN=54), one of the smallest of this tribe. That characteristic separates *P. managuensis* from the other “deep-bodied” karyotyped species and is in accordance to previous phylogenies that generally recovered a “deep-bodied” clade composed of *Heros*, *Mesonauta*, *Symphysodon* and *Uaru* as a sister-group to the “Middle American” clade (Farias et al., 2000, 2001; Concheiro-Perez et al., 2007). Inside this group we karyotyped *Heros efasciatus*, that

showed a FN=54 and *Mesonauta festivus* with a FN=62, what make them intermediate karyotypes of this group. *Pterophyllum* has an intermediate karyotype inside the group with a FN=54. Finally, the *Symphysodon aequifasciatus* karyotype is faraway the most derived of all cichlids, with a highly increased number of chromosomes ($2n=60$), the highest number of chromosome arms (FN=108) of all cichlids to date and the presence of 4 microchromosomes. The derived chromosomal patterns of *Symphysodon* probably results from rearrangement involving chromosomal pericentric inversions, translocations and fissions/fusions (Mesquita et al., 2008; Gross et al., 2009) and not polyploidy as stated before (Thompson, 1976).

Cytogenetic mapping of 18S and 5S rRNA genes

18S rRNA gene

The physical chromosome mapping of 18S and 5S rRNA genes was conducted in some representative Cichlidae species (Figures 1, 2 and 3). The ancestral condition for the location of the nuclear organizer region (NOR), that harbors the 18S rRNA genes, is supposed to be one pair of chromosomes (Feldberg and Bertollo, 1985b). In the present work FISH probing with the 18S rRNA gene showed that the Asian cichlid *E. maculatus*, despite its rearranged karyotype, has the ancestral condition of 18S rRNA cluster localized in just one pair of chromosomes (Figure 3a). In the African cichlids it seems that different rearrangements occurred involving the 18S rDNA bearing chromosome pair. Compared to the ancestral hypothetical condition, *O. niloticus* exhibit the most derived condition of the African species, with multiple sites of 18S rRNA gene spread in the short arms of 7 to 9 st/a chromosomes (Figure 2b), whereas the other African species evidenced a lower number of sites representing a lesser derived condition (Figure 2f,k,l).

The FISH probing with 18S rRNA gene in all Neotropical cichlids but *G. brasiliensis*, which has 3 marked chromosomes with heteromorphic sites (Figure 2e), shows a conservative state related to the number, presenting one pair of 18S rDNA bearer chromosomes, what is probably an ancestral condition for this group (Feldberg and Bertollo, 1985b). Furthermore, the location in the short arms of a st/a chromosome pair, appears to be common for *A. tetramerus*, *L. dorsigera*, *H. efasciatus* and *P. scalare* (Figure 2i,k,l,n). Another pattern for 18S rRNA gene position is represented by a large pair of m/sm with interstitial clusters, probably originated by paracentric inversion, in *A. ocellatus*, *C. flavescens*, *B. cupido*, *C. vitatta*, (Figure 2c,d,g). On the other hand, *Cichla kelberi*, despite having the supposed ancestral karyotype, has the 18S rDNA cluster located in the terminal position of the long arm of a large acrocentric pair, what seems to be a derived condition for the group (Figure 2a). The 18S rDNA sites were mostly coincident with secondary constrictions observed in the Giemsa stained karyotypes (Figure 2). Heteromorphic sites of the 18S rDNA was frequent in some species of the analysed Neotropical cichlids as *A. ocellatus*, *C. flavescens*, *G. brasiliensis*, *C. lepidota*, *S. jurupari* and *H. efasciatus* (Figure 2, c,d,e,g,h,k). The size heteromorphism between the homologous 18S rDNA sites is frequent for this group (Feldberg and Bertollo 1985b, Brum et al, 1998, Vicari et al., 2006), and is probably originated by unequal permutation during meiosis an/or exchanges between sister chromatids of these regions.

5S rRNA gene

FISH using the 5S rRNA gene as probe marked three different pairs of chromosomes in the tilapiine fish *O. niloticus*: the first in an interstitial position of a

st/a pair, the second in the short arm of a st/a pair, and the last in the centromeric region of the largest pair (Figure 3a). *Haplochromis obliquidens* showed 15 sites localized in the centromeric region of chromosomes, including the largest pair (Figure 3b). The mapping of 5S rDNA genes to Neotropical cichlids showed the presence of two to four interstitial sites in st/a chromosomes (Figure 3c,d,e,f,g,h,i,j,k). The variation of visible 5S signals can be related to the number of clustered repeats.

The presence of 5S rDNA cluster in the largest chromosome pair of *O. niloticus* and in the largest pair of *H. obliquidens* are an evidence for homology of these specific pair of chromosomes as also suggested by the comparative mapping of other repeated DNA sequences (Ferreira et al., in preparation). The interstitial sites of 5S rDNA in a st/a chromosome pair in all cichlids, except *H. obliquidens*, suggest that such chromosome could be the ancestral condition for the 5S clusters distribution among cichlids.

To date few studies have been conducted to map rRNA genes on cichlid chromosomes. The ribosomal RNA genes were previously mapped only to the chromosomes of the cichlids *O. niloticus* (Martins et al., 2000; 2002), *Geophagus brasiliensis* and *Cichlasoma facetum* (Vicari et al., 2006). It is worthy to note that the African species possess multiple 18S and 5S sites, whereas the South American ones possess only one to two chromosomal sites for each gene class. Another interesting characteristic related to the chromosomal position of the rRNA genes sites, with few exceptions, is the fact that the 5S sites are located in an interstitial position within the cichlid chromosomes, and the 18S sites were mostly located in terminal positions. These characteristics were also observed for several other fishes, which suggest that such a chromosomal pattern for the distribution of rRNA genes seems to be a trend in this vertebrate group.

Conclusion

The Asian species *E. maculatus* showed one of the biggest number of transformations when compared to the Perciformes basal karyotype and to all other cichlid karyotypes described to date, paralleling the South American *Symphysodon aequifasciatus* karyotype (Figure 6).

All African cichlid species analyzed in this work (Figure 6) have shown a diploid number $2n=44$, except *Tilapia mariae* and *Astotilapia burtoni* ($2n=40$). The African tilapiines present a karyotypic structure sufficiently conserved with the remarked presence of mostly st/a chromosomes. The presence of a large subtelocentric chromosome pair, that is the first pair of the complement in *O. aureus*, *O. niloticus*, *T. mariae*, *T. mamfe*, *O. mossambicus* and *O. tanganyicae*, is an excellent marker for the group of tilapiines (Figure 6). On the other hand the haplochromines show differentiated karyotypes from the tilapiines, despite having the same number of chromosomes. The haplochromines show a higher FN with the presence of five to seven m/sm pairs (Figure 6). Furthermore, the two larger pairs of chromosomes (first m/sm pair and first st/a pair) stand out compared to the other chromosomes of complement which make them good markers for this group.

The diploid number of chromosomes of Neotropical cichlids (Figure 6) have a modal number of $2n=48$, with exception of *Apistogramma borelli* ($2n=46$), *Laetacara dorsigera* ($2n=44$), and *Shymphysodon aequifasciata* ($2n=60$). The KF for South American cichlids range from *Cichla* sp. with KF=48 st/a, considered the most basal karyotype, to *Symphysodon aequifasciatus* with KF=50m/sm-6st/a and 4 microchromosomes, the most derived of all.

Pericentric inversions are thought to be the main mechanism thought to account for changes in the basal chromosome arm size of Perciformes (Galetti Jr. et

al., 2000; Affonso and Galetti Jr., 2005) and this mechanism of chromosomal rearrangement and also translocations probably have acted in the karyotype diversification of South American cichlids. The chromosome number variation observed in some species suggests that events of chromosomal translocation followed by chromosome fission and fusion were also involved.

It remains to be investigated the relationship among specific events of chromosome rearrangements (fusion, fission, inversion) that occurred during the evolutionary history of cichlids and any particular characteristic of their genomes. Particularly among the African species, the chromosomal fusions detected seem to involve homologous chromosomes in non-related species of tilapiines and haplochromines, as observed in *Oreochromis karongae*, *Tilapia mariae* and *Astatotilapia burtoni*. This observation opens a myriad of questions related to the genomic content of specific chromosomes that could favors event of chromosomal rearrangements.

Acknowledgements

The study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

A bibliografia deste trabalho se encontra listada no item **6. Referências Bibliográficas**, desta tese, na página 100.

Tables

Table 1: Investigated African and South Asian Cichlids.

Subfamilies and species	Origin	Major groups	Number of analyzed animals	Karyotypic formulae	2n	FN
Etoplinae						
<i>Etoplus maculatus</i>	Petshop, Botucatu, SP Brazil		03	18m/sm+18st/a+10mi	46	54
Pseudocrenilabrinae						
<i>Oreochromis aureus</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		03	2m/sm+42st/a	44	46
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		04	4m/sm+40st/a	44	48
<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio Tietê, Botucatu, SP, Brazil CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brazil Institute of Aquaculture, Stirling University, Stirling, Scotland.	Tilapiines	22	2m/sm+42st/a	44	46
<i>Oreochromis tanganicae</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		01	2m/sm+42st/a	44	46
<i>Tilapia mariae</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		02	8m/sm+32st/a	40	48
<i>Tilapia mamfe</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		01	10m/sm+34st/a	44	54
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil	Hemichromine	01	4m/sm+40st/a	44	48
<i>Astatotilapia burtoni</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		03	14m/sm+26st/a	40	54
<i>Aulonocara baenschi</i>	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		03	12m/sm+32st/a	44	56
<i>Cynotilapia afra</i>	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		01	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Gephyrochromis moorii</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil		03	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Haplochromis livingstonii</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil		01	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Haplochromis obliquidens</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil		01	12m/sm+32st/a	44	56
<i>Labeotropheus trewavase</i>	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA	Haplochromines	01	10m/sm+34st/a	44	54
<i>Melanochromis auratus</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil					
	Tropical Aquaculture Facility, UMD, USA		02	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Metriaclima barlowi</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil					
	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		06	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Metriaclima gold zebra</i>	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		04	12m/sm+32st/a	44	56
<i>Metriaclima lombardoi</i>	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		22	14m/sm+30st/a	44	58
	Petshop, Botucatu, SP, Brazil					
<i>Metriaclima pyrrsonotus</i>	Tropical Aquaculture facility, UMD, USA		08	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Pseudotropheus tropheops</i>	Petshop, Botucatu, SP Brazil		01	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Pseudotropheus zebra</i>	Petshop, Botucatu, SP Brazil		01	14m/sm+30st/a	44	58
<i>Pseudotropheus SP</i>	Petshop, Botucatu, SP Brazil		01	14m/sm+30st/a	44	58

Table 2: Investigated South American Cichlids.

Species	Origin	Tribe	Number of analyzed animals	Karyotypic formulae	2n	Fn
<i>Cichla temensis</i>	Tocantins river, Tucuruí, TO, Brazil	Cichlini	17	48st/a	48	48
<i>Cichla orinocensis</i>	Orinoco River, Caicara, Venezuela		01	48st/a	48	48
<i>Cichla piquiti</i>	Araguaia River, São Felix do Araguaia, MT, Brazil		04	48st/a	48	48
<i>Cichla kelberi</i>	Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil		12	48st/a	48	48
	Tietê River, Bariri, SP, Brazil					
<i>Retroculis lapidifer</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil	Retroculini	02	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Astronotus ocellatus</i>	Tietê River, Barra Bonita, SP, Brazil	Astronotini	09	12m/sm+36st/a	48	60
<i>Chaetobranchius flavescens</i>	Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil	Chaetobranchini	01	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Apistogramma borellii</i>	Comprida Lagoon, Aquidauana, MS, Brazil	Geophagini	05	16m/sm+30st/a	46	62
<i>Biotodoma cupido</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil		07	4m/sm+44st/a	48	52
	Araguaia River, São Félix Araguaia, MT, Brazil					
<i>Crenicichla lepidota</i>	Comprida Lagoon, Aquidauana, MS, Brazil		05	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Crenicichla strigata</i>	Araguaia River, Barra do Garças and São Félix do Araguaia, MT, Brazil		03	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Crenicichla britskii</i>	Olaria River, Poloni, SP, Brazil	Geophagini	01	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Crenicichla aff britskii</i>	Olaria River, Poloni, SP, Brazil		01	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Crenicichla aff haroldoi</i>	Olaria River, Poloni, SP, Brazil		01	6m/sm+42st/a	48	54

<i>Geophagus brasiliensis</i>	Olaria River, Poloni, SP, Brazil Araquá River, Botucatu, SP, Brazil Bonito River, Barra Bonita, SP, Brazil Paratinguinha River, Salesópolis, SP, Brazil Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil Tietê River, Buritama, SP, Brazil Engenheiro Taveira River, Araçatuba, SP, Brazil	Geophagini	07	2m/sm+46st/a	48	50
<i>Geophagus proximus</i>			04	4m/sm+44st/a	48	52
<i>Geophagus cf proximus</i>			04	4m/sm+44st/a	48	52
<i>Geophagus surinamensis</i>	Orinoco River, Caicara, Venezuela		03	4m/sm+44st/a	48	52
<i>Satanoperca jurupari</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil		16	4m/sm+44st/a	48	52
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Comprida Lagoon, Aquidauana, MS, Brazil		09	12m/sm+36st/a	48	60
<i>Aequidens tetramerus</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil Araguaia River, São Félix do Araguaia, MT, Brazil		09	12m/sm+36st/a	48	60
<i>Cichlasoma facetum</i>	Campo Novo River, Bauru, SP, Brazil		06	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Cichlasoma nigrofasciatum</i>	Paratinguinha River, Salesópolis, SP, Brazil Petshop, Botucatu, SP, Brazil	Cichlasomatini	13	8m/sm+40st/a	48	56
<i>Cichlasoma paranaense</i>	Carrapato River, Penápolis, SP, Brazil Batata River, Miracatú, SP, Brazil Faú River, Miracatú, SP, Brazil		08	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Laetacara dorsigera</i>	Bahia River, Pracinha, PR, Brazil		01	4m/sm+40st/a	44	48
<i>Heros efasciatus</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil Araguaia River, São Félix Araguaia, MT, Brazil		03	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Mesonauta festivus</i>	Araguaia River, Barra do Garças, MT, Brazil Araguaia River, São Félix Araguaia, MT, Brazil		10	14m/sm+34st/a	48	62
<i>Parachromis managuensis</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil	Heroini	01	6m/sm+42st/a	48	54
<i>Pterophyllum scalare</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil		04	6m/sm+42st/a	48	68
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Petshop, Botucatu, SP, Brazil		02	50m/sm+4st/a+4mi	60	108

Figure Captions

Figure 1: Giemsa stained karyotypes of Asian and African cichlids. Karyotypes of *Etroplus maculatus* (a), *Oreochromis niloticus* (b), *Tilapia mariae* (c), *Tilapia mamfe* (d), *Hemichromis bimaculatus* (e), *Labeotropheus trewavase* (f), *Astatotilapia burtoni* (g), *Aulonocara baenschi* (h), *Cynotilapia afra* (i), *Metriaclima gold zebra* (j), *Haplochromis obliquidens* (k) and *Melanochromis auratus* (l). The 18S rDNA probed chromosomes of karyotypes are in evidence. Scale bar, 10 μ m.

Figure 2: Giemsa stained karyotypes of South American cichlids. Karyotypes of *Cichla kelberi* (a), *Retroculus lapidifer* (b), *Astronotus ocellatus* (c), *Chaetobranchus flavescens* (d), *Geophagus braziliensis* (e), *Biotodoma cupido* (f), *Crenicichla lepidota* (g), *Satanoperca jurupari* (h), *Aequidens tetramerus* (i), *Laetacara dorsigera* (j), *Heros efasciatus* (k), *Mesonauta festivus* (l), *Parachromis managuensis* (m), *Pterophyllum scalare* (n). The 18S rDNA probed chromosomes are in evidence, with the pair identified when it was possible. Scale bar, 10 μ m.

Figure 3: FISH metaphase spreads of cichlids, probed with 5S rRNA gene sequences. The hybridization sites are indicated by an arrow head. Metaphasic chromosomes of *Oreochromis niloticus* (a), *Haplochromis obliquidens* (b), *Chaetobranchus flavescens* (c), *Cichla pikiti* (d), *Crenicichla vitatta* (e), *Laetacara dorsigera* (f), *Geophagus surinamensis* (g), *Geophagus braziliensis* (h), *Cichlasoma paranaense* (i), *Cichlasoma paranaense* (j) and *Aequidens plagiozonatus* (k). Scale bar, 10 μ m.

Figure 4: Karyotype data plotted on a phylogenetic tree of Cichlidae family, based on the phylogenies proposed by Smith et al. (2008) and by Klett and Meyer (2002). It is indicated in red the variations of KF inside genera or species as well as the variation in the modal number of chromosomes inside a group.

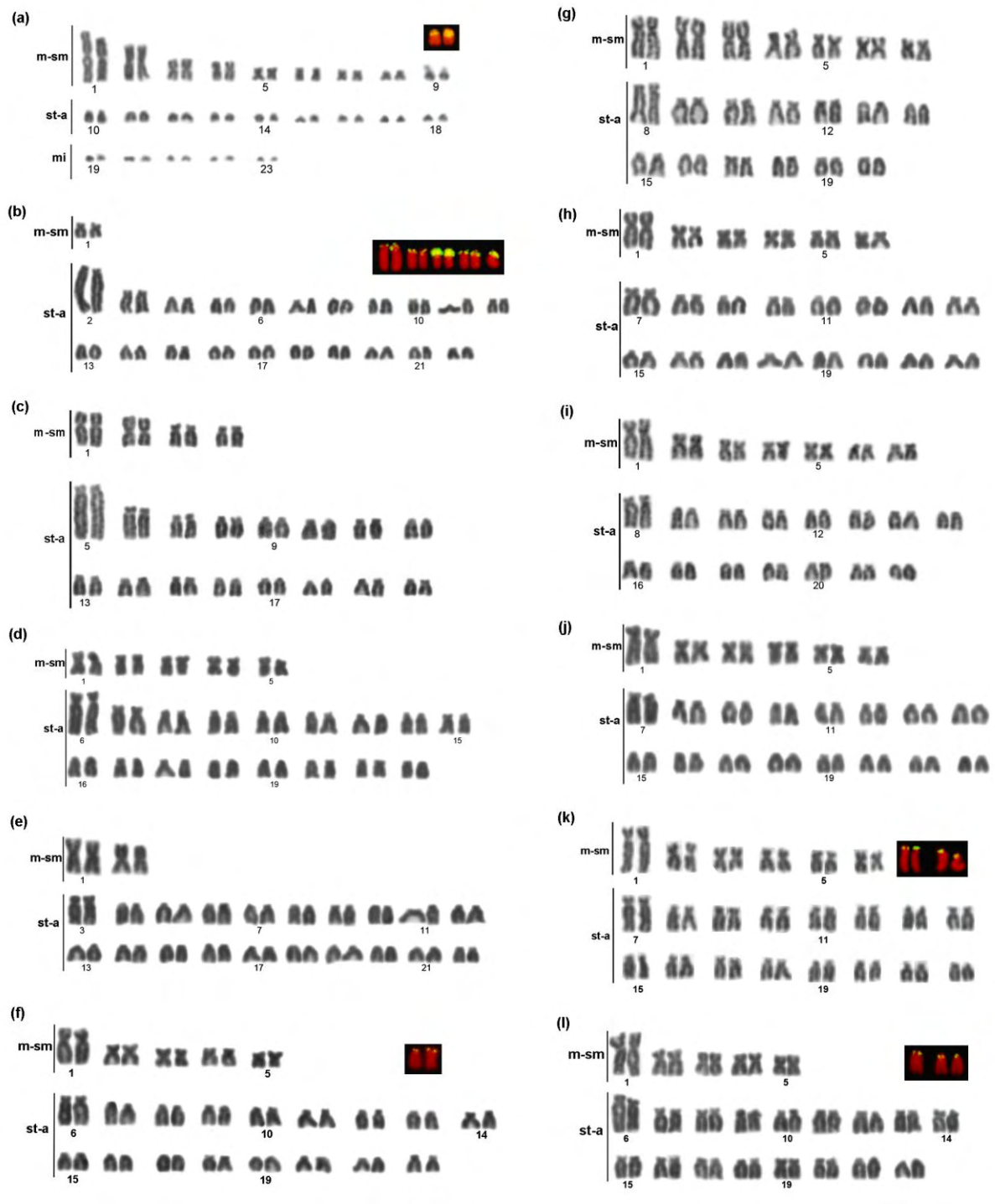


Figure 1

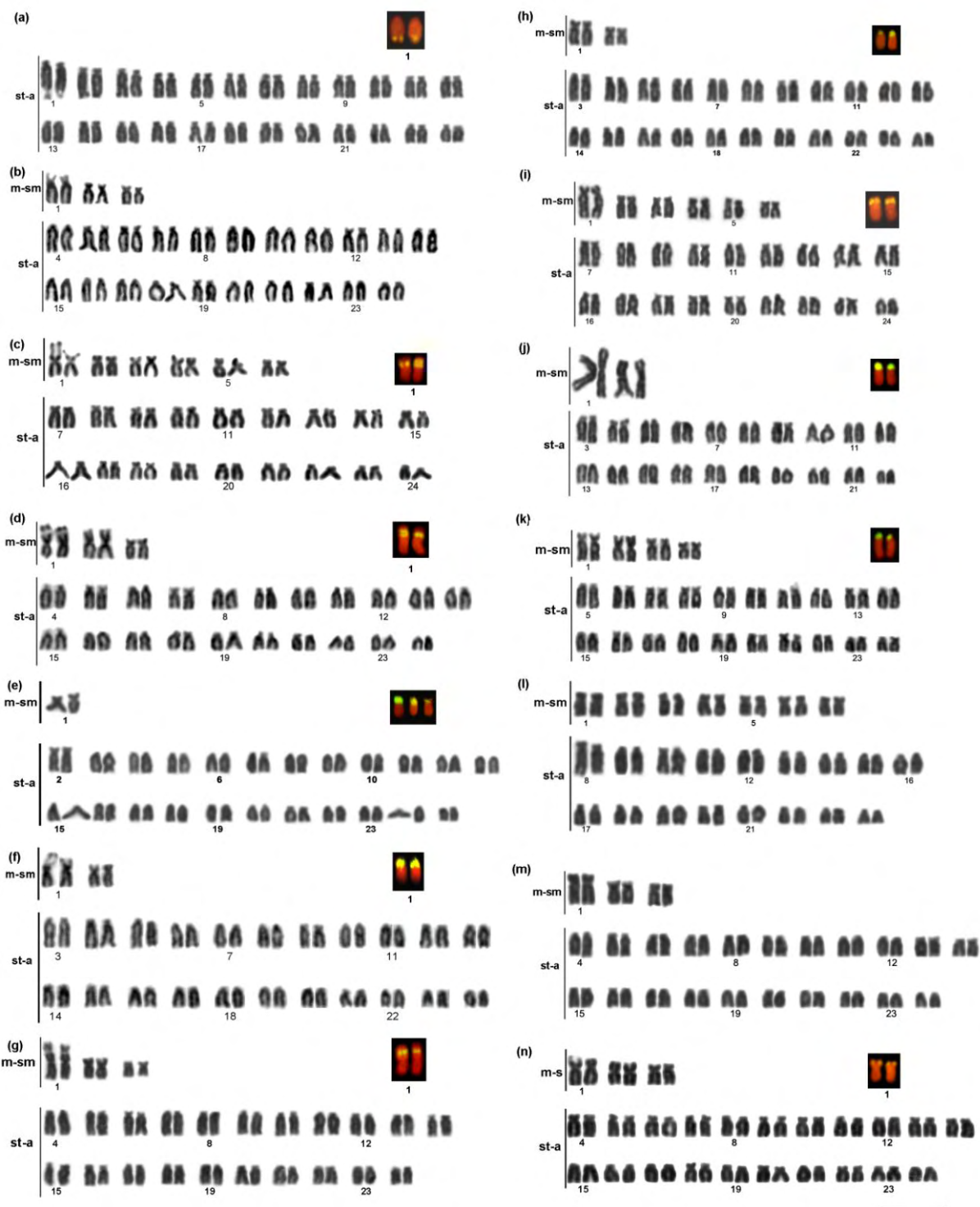


Figure 2

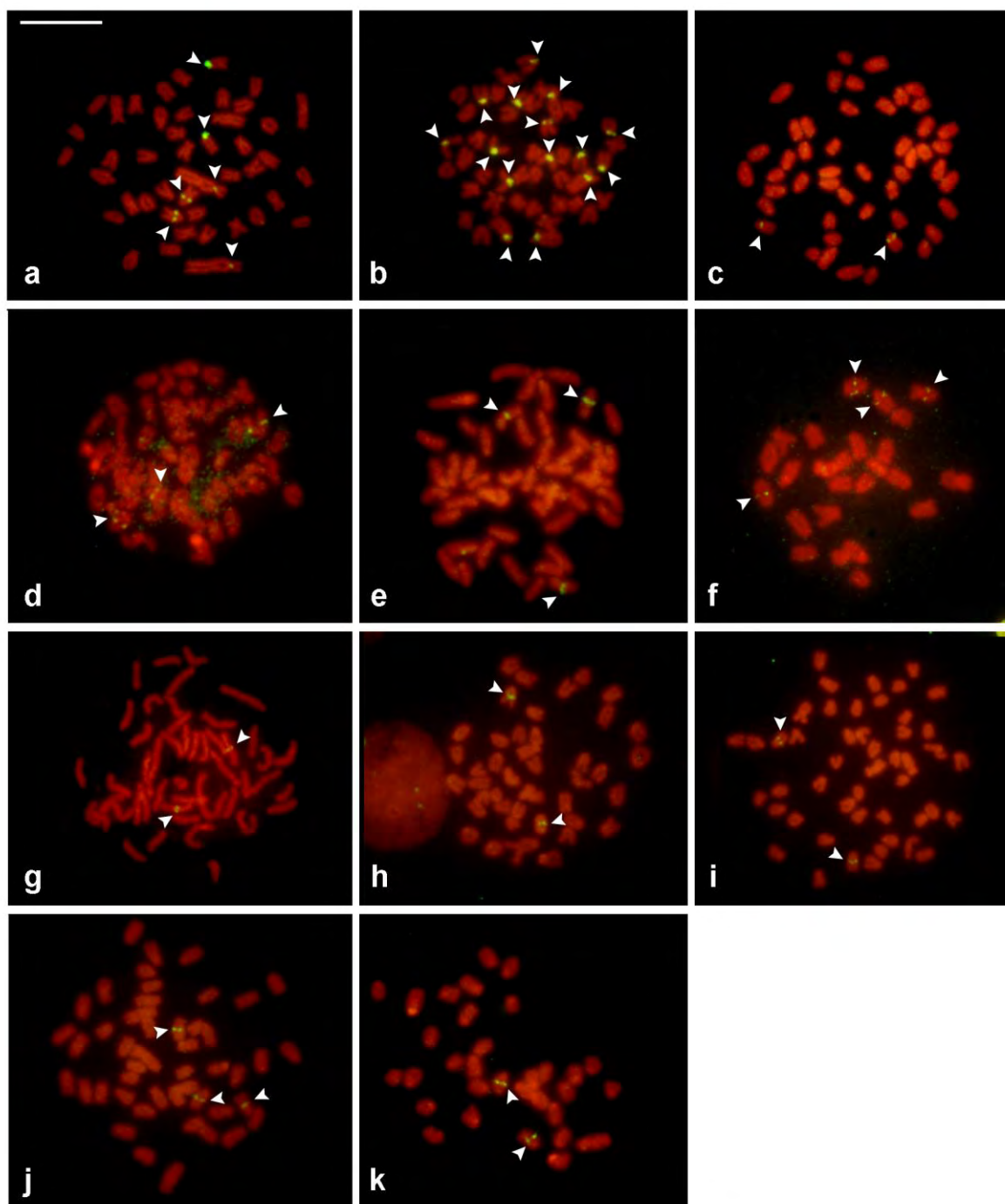


Figure 3

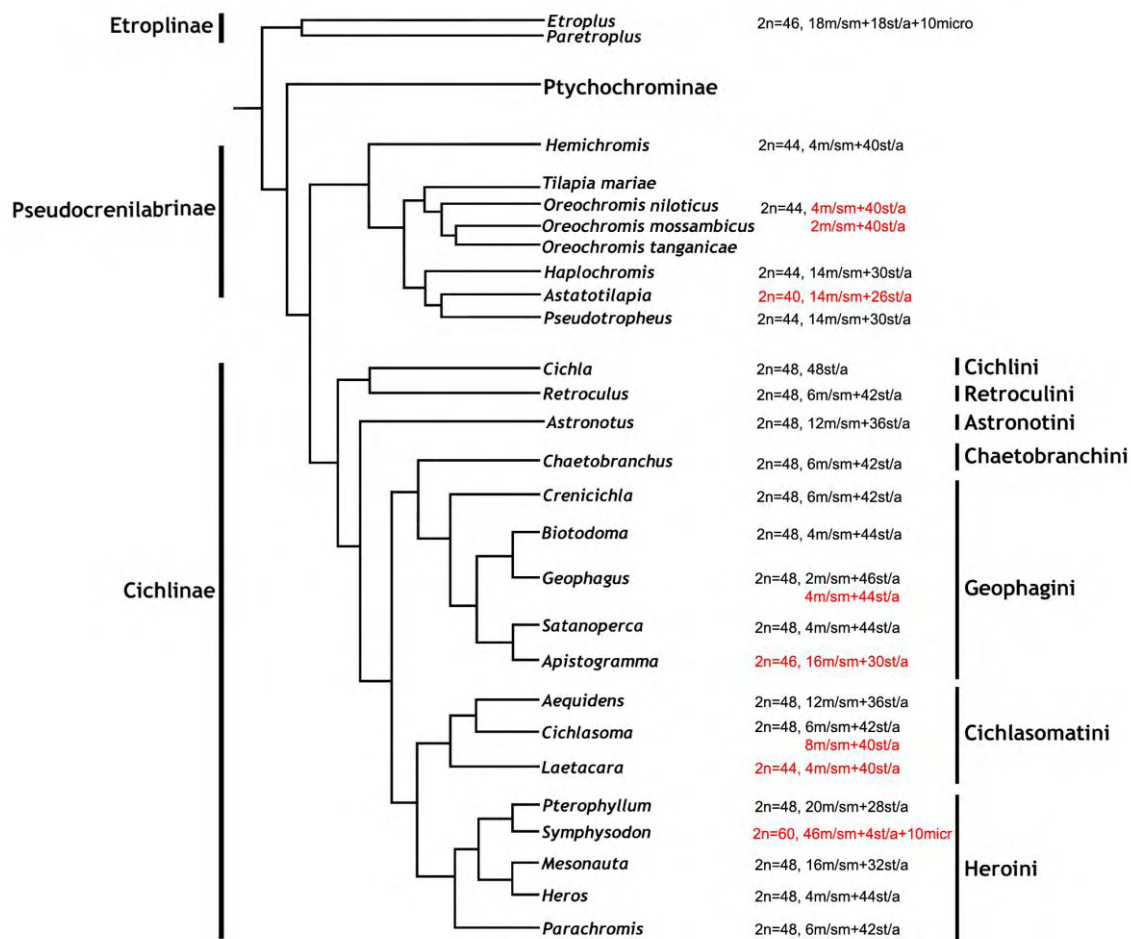


Figure 4

4.2 CAPITULO II:

Accumulation of 18S rDNA and repetitive DNA sequences in the B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens*

Abstract

Cytogenetic studies of the cichlid fish *Haplocromis obliquidens* have identified one or two large B-type chromosome(s) occurring in 39.6% of the analyzed individuals (both male and female). To better characterize the karyotype and assess the nature of the B chromosome, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed using probes for telomeric DNA repeats, 18S rRNA genes, SATA centromeric satellites, and bacterial artificial chromosomes (BACs) enriched in repeated DNA sequences. The B element is enriched in repeated DNAs, especially non-active 18S rRNA gene-like sequences. Our results suggest that the B chromosome could have originated from an rDNA bearing subtelo/acrocentric A chromosome through formation of an isochromosome, or by accumulation of repeated DNA sequences in a small proto-B-type chromosome derived from the A complement.

Introduction

Perciform fishes are the largest order of vertebrates and include the family Cichlidae, which represents the most species-rich vertebrate family, with more than 3,000 species (Kocher, 2004). Cichlid fishes are native to tropical areas of the Americas, Africa and Asia and have undergone spectacular adaptive radiation in the lakes of east Africa (Fryer and Iles, 1972). Cichlid fishes from the East African Rift Lakes Victoria, Tanganyika, and Malawi represent an example of rapid evolutionary radiation. This group of fishes is an important model for evolutionary processes, mostly because their great phenotypic diversity has evolved in a short period of time, among lineages with similar genomes (Won et al., 2005; Won et al., 2006; Hulsey, 2006). In addition, some species of Cichlidae, such as the tilapiines *Oreochromis*, *Tilapia* and *Sarotherodon*, are very important for aquaculture (Trewavas, 1983). Because of their economic and evolutionary importance, cichlid fishes have been the focus of several genetic and genomic studies (Cnaani and Hulata, 2008), but they have received only limited attention from cytogeneticists. Cytogenetic studies have shown that most cichlids from Central and South America have 48 chromosomes, while African species have 44 chromosomes (Feldberg et. al., 2003), with some characteristic chromosome pairs within each group (Poletto et al., manuscript in preparation).

Many animal, plant and fungal populations have accessory chromosomes, also known as B-type chromosomes or supernumerary chromosomes. B chromosomes are additional, dispensable chromosomes that are present in some individuals in some species. Most of these chromosomes probably arose from A chromosomes, but have followed their own evolutionary pathways (Beukeboom, 1994). Furthermore, B-type chromosomes have irregular and non-Mendelian modes

of inheritance and are not believed to undergo recombination with any members of the basic A chromosome set (Jones, 1995). They are characteristically smaller than A chromosomes and are mostly heterochromatic (Jones and Rees, 1982). Supernumerary chromosomes may have originated through chromosomal breakage and fusion of A chromosome(s) in a single species or by hybridization between species (Camacho et al., 2000).

The occurrence of supernumerary chromosomes has been described for species of diverse fish groups. In general, the supernumerary chromosomes of fishes vary in number from one to eight (Pauls and Bertollo, 1983; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000). The size of the extra chromosomes can vary greatly, from macro-chromosomes as found in *Astyanax* sp. (Maistro et al., 1992; Salvador and Moreira-Filho, 1992; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Ferro et al., 2003) and *Alburnus alburnus* (Ziegler et al. 2003, Schmid et al., 2006), medium-sized chromosomes, as in *Rhamdia* sp. (Fenocchio and Bertollo, 1990; Fenocchio et al., 2000), small-sized chromosomes, as in *Parauchenipterus galeatus* (Lui et al., 2009), or microchromosomes, as in *Prochilodus* sp. (Pauls and Bertollo, 1983; 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003).

Supernumerary chromosomes have been described for only a few species of South American cichlids. They were first described in the male germinative cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Feldberg and Bertollo, 1984) and later found in *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis* and *Crenicichla niederleinii* (Martins-Santos et al., 1995). Supernumerary microchromosomes have also been described for *Cichla monoculus*, *Cichla* sp. and *Crenicichla reticulata* (Feldberg et al., 2004). The presence of B chromosomes among the African cichlids has not previously been reported.

Despite being widely distributed among fish taxa, the genomic nature and genetic behavior of supernumerary chromosomes are still poorly understood. In this study, we performed molecular cytogenetic analysis on the African cichlid fish *H. obliquidens*, in order to better understand the chromosomal organization and meiotic behavior of B chromosomes present in individuals of this species.

Materials and Methods

Specimens, and chromosome preparation and banding

We analyzed ninety-six specimens of *H. obliquidens* (46 males, 33 females and 17 of undetermined sex) obtained from the aquarium trade in Botucatu, SP, Brazil. Metaphase chromosomes were obtained from cells of the anterior kidney following *in vivo* treatment with colchicine at 0.025% (1 ml/100 g of body weight) according to the air-drying method (Bertollo et al., 1978). Heterochromatin was identified by C-banding (Sumner, 1972), and the nucleolus organizer regions were visualized by silver nitrate staining (Ag-NORs) as described by Howell and Black (1980). Chromosomes were classified as meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocentric (st/a), and were organized by decreasing order of size in the karyotype. Meiotic cells from testes were obtained as described by Kligerman and Bloom (1977).

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed to map repeated DNAs on the mitotic and meiotic chromosomes of *H. obliquidens*. Four DNA probes containing sequences of different classes of repeated DNA were used for chromosome hybridization. (i) 18S rDNA probe: a segment of 1,400 base pairs (bp)

of the 18S rRNA gene of *H. obliquidens* was obtained by the polymerase chain reaction (PCR) with the primers 18Sf 5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT and 18Sr 5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA. The 18S primers were designed from the catfish *Ictalurus punctatus* (GenBank accession number AF021880) and have been successfully used to amplify 18S rRNA genes of different fish species (Cioffi et al., 2009; Teixeira et al., 2009). (ii) SATA satellite: repeated satellite DNA isolated and cloned from *O. niloticus* (Ferreira and Martins, 2008); (iii) Telomeric DNA sequences: *in vitro* synthesized oligomers of telomeric repeats (GGGTTA)₇/(TAACCC)₇. (iv) Clones BAC-C4E09 and BAC-C5E01: Bacterial artificial chromosomes containing several classes of repeated elements from the *O. niloticus* genome (Ferreira and Martins, 2008).

Probes were labeled by nick translation with biotin 14-dATP (Bionick labeling system-Invitrogen). After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide/2× SSC for 40 seconds at 70 °C, hybridization mixtures containing 100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2× SSC and 50% formamide, in a final volume of 30 µl, were dropped on the slides and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a 2x SSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 45 °C in 2x SSC/50% formamide for 15 min, followed by a second wash in 2x SSC for 15 min, and a final wash at room temperature in 4x SSC for 15 min. Detection of hybridized probes was carried out with 0.07% avidin FITC conjugate (Sigma) in C buffer (0.1 M NaHCO₃ /0.15 M NaCl) for 1 h, followed by two rounds of signal amplification using 2.5% anti-avidin biotin conjugate (Sigma) in blocking buffer (1.26% NaHCO₃, 0.018% sodium citrate, 0.0386% Triton X-100 and 1% non-fat dried milk) for 30 min. Each treatment with anti-avidin biotin conjugate was followed by a treatment with avidin-FITC. The treatments with avidin-FITC and anti-avidin-biotin

were conducted in a 2x SSC moist chamber at 37 °C. After each amplification step, the slides were washed three times for 5 min each in blocking buffer at 42 °C. Chromosomes were counterstained with propidium iodide diluted in antifade (Vectashield Mounting Medium, Vector). Hybridized chromosomes were visualized using an Olympus BX 61 microscope, and images were captured with a digital camera Olympus DP70 with the software Image-Pro MC 6.0. Karyotypes and metaphases were arranged with Adobe Photoshop 7.0 software.

Results

Basic cytogenetic analysis

H. obliquidens exhibited diploid chromosome numbers of $2n=44$, composed of 7 m/sm and 15 st/a chromosomes, without sex-related heteromorphism (Fig. 1a). The most remarkable characteristic observed was the presence of one or two large metacentric extra chromosomes (Fig. 1). Out of 96 analyzed specimens, 58 individuals had no extra chromosomes, 30 individuals had one extra chromosome and eight individuals had two extra chromosomes (Table 1). The extra chromosome(s) of all individuals were present in 100% of the analyzed cells. Such data strongly support that these extra-chromosomal elements correspond to B-type chromosomes.

Active nucleolus organizer regions (NOR) were identified in the short arms of four to five chromosomes in the A complement, but were absent in the B-type chromosomes (Fig. 1b). Constitutive heterochromatin was detected in the pericentromeric regions of most A chromosomes as well as on the entire length of the B chromosomes (Fig. 1c, 2c).

Physical chromosomal mapping of repeated DNAs

Chromosomal hybridization with 18S rDNA probe identified four to six sites in the short arms of st/a chromosomes of the A complement. The number variation of 18S rDNA sites in the A chromosomes was not correlated with the presence or absence of B chromosomes. In addition, 18S rDNA clusters were observed in both telomeric regions and pericentromeric areas of the supernumerary chromosomes (Fig. 2b).

Chromosomal hybridization with 5S rDNA probe marked in the pericentromeric region of 15 chromosomes. But no signal was identified on the B chromosome (Fig. 2a).

Chromosomal mapping with the clone BAC-C4E09 from the *O. niloticus* genomic library, which contains LINE-like retrotransposons and satellite DNAs (Ferreira and Martins, 2008), labeled the short arms of two pairs of st/a chromosomes of the A complement (one of them being the largest chromosome pair), and evidenced weak signals along the whole extension and a strong cluster in the pericentromeric region of the B chromosomes (Fig. 1d). Chromosomal mapping with the clone BAC-C5E01, which also contains repetitive elements of the *O. niloticus* genome, evidenced strong signals in the short arms of some st/a chromosomes, in almost the whole extent of the largest A complement chromosomes, and in the centromeric region of the B chromosomes (Fig. 2d).

Chromosomal mapping with the SATA-satellite DNA isolated from *O. niloticus* labeled the centromeric region of all A chromosomes, but showed no clearly visible signal in the centromeric region of the supernumerary chromosomes (Fig. 2e), although a faint signal was detected in the centromeric region of few metaphase B chromosomes (Fig. 2e).

Chromosome mapping with the telomeric (GGTTA)_n probe labeled all the telomeres, including the telomeres of B chromosomes, and no interstitial signals were observed in either A and B chromosomes (Fig. 2f).

Meiotic analysis

Meiotic chromosomes of mature male *H. obliquidens* with one or two B chromosomes were analyzed. Chromosomes were Giemsa-stained, C-banded and *in situ* hybridized with the 18S rDNA probe (Fig. 3). As expected in diakinesis, 22 bivalents resembling the 44 A chromosomes and one or two univalent B chromosome(s) were observed (Fig. 3a). Although it was difficult to identify the B chromosome(s) among the A elements in the Giemsa-stained meiotic spreads, they were clearly distinguished by C-banding because they appeared totally heterochromatic (Fig. 3b). The hybridization of 18S rDNA in diakinesis meiotic cells containing two B chromosomes evidenced the formation of ring-like univalents in most analyzed cells (Fig. 3c). However, the two Bs appeared to be slightly associated in few cells (Fig. 3d).

Discussion

Basic cytogenetic analysis

The African cichlids have a modal diploid number of 2n=44 chromosomes, with variation ranging from 32 to 48 chromosomes, and a fundamental number of chromosome arms between 44 and 88 (Feldberg et al., 2003). Therefore, the standard karyotype we identified is consistent with previous reports. In addition to the standard cichlid karyotype pattern, a large metacentric B chromosome was observed at high frequency among the sampled animals, representing the first description of B-

type chromosome occurrence in African cichlids. One notable characteristic of the extra chromosome found in this species is its large size, which is almost the same as the largest pair of the A complement. Such a high number of individuals with B(s) (35 out of 94, which accounts for 39.6% of the population), is not commonly observed in studies of B chromosomes, despite the fact that number of individuals with B chromosome can vary in natural fish populations (Ziegler et al., 2003). Considering that the *H. obliquidens* population was obtained from the aquarium trade, the high number of individuals with B chromosomes could be a consequence of founder effects from a small population of breeders.

Accumulation of repetitive DNAs in the B chromosomes

Heterochromatic B chromosomes, as seen in our samples, are a common feature of fish species (Pauls and Bertollo, 1983;; Hochberg et al., 1985; Oliveira et al., 1988; Almeida-Toledo et al., 1992; Venere et al., 1999). However, some cases of euchromatic supernumerary chromosomes have also been described in fish, such as *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al., 1989) and *Characidium* cf. *zebra* (Venere et al., 1999). The heterochromatin of the B chromosomes of *H. obliquidens* is enriched in repetitive DNAs, as evidenced by mapping with the clones BAC-C4E09 and BAC-C5E01. These BACs contain repetitive DNAs with similarity to the LINE retrotransposons of *Haplotaxodon microlepis* and *O. niloticus*, the SATB satellite DNA of *O. niloticus*, and repeated segments of the *Danio rerio* genome (Ferreira and Martins, 2008). The presence of repeated sequences with similarities to retrotransposons in a B chromosome has been previously reported for the fish *Astyanax scabripinis* (Mestriner et al., 2000), as well as for the B chromosome of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (McAllister 1995; McAllister and Werren, 1997).

A retrotransposon also appears to be involved in the transposition of chloroplast DNA into the repeated element Bd49 of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Franks et al., 1996). The repeated elements are thought to accumulate in the heterochromatic regions of chromosomes, which are characterized by lower gene density and reduced recombination (Szauter, 1984). The absence of recombination of B chromosomes of *H. obliquidens*, as shown by the univalent conformation that they assume during meiosis, may facilitate the accumulation of repeated DNA. Repetitive DNAs were long considered to be junk DNA because they had no clearly identified function (Doolittle and Sapienza, 1980; Orgel et al., 1980). However, further studies of their accumulation in specific genomic areas, causing chromosome rearrangements through breakages, deletions, inversions and amplifications (Lim and Simmons, 1994; Dimitri et al., 1997), have shown they can operate at the chromosomal level in the speciation process. These recent findings have suggested that junk DNA may be one of the major drivers of genome evolution (Biémont and Vieira, 2006). Consequently, the study of repetitive DNA in B chromosomes could yield great insights into the evolutionary mechanisms involved with the origin and evolution of particular chromosome elements.

Presence of rDNA clusters in the B chromosome

Another remarkable characteristic described here is the presence of 18S rRNA gene copies in both telomeric regions and centromeric areas of the B chromosome. The presence of rDNA sequences in the B chromosome suggests its possible origin from A chromosomal elements that harbor clusters of 18S rRNA genes. To the best of our knowledge, this is the first report of rDNA sites clustered in a B chromosome of a fish species. The presence of extra rDNA could initially increase transcription rates

and, consequently, growth (Camacho et al., 2000); this characteristic could initially have represented an advantage to the bearers of the extra chromosome. On the other hand, the 18S rDNA sites in the B chromosomes of *H. obliquidens* appeared not to be stained by silver nitrate, suggesting that they are not actually being transcribed, as silver has a strong affinity for the proteins that are assembled during nucleolus formation (Sumner, 1990). The absence of transcription shows that the ribosomal genes in the B chromosome are inactive or may even be variant copies (pseudogenes) of the true 18S rRNA genes.

Previous studies have found evidence of dispersed or clustered elements similar to 45S rDNA in several eukaryotic genomes. These elements have mainly been characterized as noncoding, small-unit tandem repeats of variable copy number. Such elements have been identified in various eukaryotic species, including yeast (Childs et al., 1981), animals (Lohe and Roberts, 1990), and plants (Falquet et al., 1997). Moreover, some authors have hypothesized that ribosomal cistrons could undergo active transposition followed by tandem amplification (Schubert and Wobus, 1985; Suzuki et al., 1990; Foote et al., 1991; Galetti Jr. and Rasch, 1993; Galetti Jr. et al., 1995; Reed and Phillips, 1995; Castro et al., 1996). This transposition event could be facilitated by recombination between preexisting repetitive DNAs in the constitutive heterochromatins and/or rDNA clusters. Repeated DNAs seem to be associated with ribosomal DNAs in *A. scabripinnis*, facilitating recombination between terminal segments in the same chromosome pair or between terminal portions from non-homologous chromosomes (Mestriner et al., 2000; Mantovani et al., 2004). The results presented here for *H. obliquidens* show that similar copies may have originated from the true 18S rRNA genes and further accumulated in the B chromosomes through the same mechanism that drives the evolution of repeated

DNAs. These mechanisms could have been involved in the distribution of rDNA copies in B chromosomes of *H. obliquidens*. Moreover, the regions of chromosomes with repetitive DNAs, including 18S rDNA copies, are among the last regions of the genome to segregate during cell division, as previously reported in yeast (D'Amours et al., 2004, Sullivan et al., 2004), and may therefore be involved in the nondisjunction and accumulation of the B chromosome in *H. obliquidens* cells.

Possible origin and evolution of the B chromosome

The meiotic behavior of the B chromosome shows that it does not associate with any of the A chromosomes and does not form true bivalents in the cell when two Bs are present during prophase I of meiosis. The two Bs appeared slightly associated in metaphasic images of a few cells, probably as consequence of the similarity of their repetitive content. The chromosomes appeared to associate through the rDNA sequences in the terminal regions. Indeed, this slight association, rarely seen in the majority of analyzed meiosis plates of *H. obliquidens*, could be favored due to the accumulation of the 18S rDNA repeats on both B-chromosome arms. Furthermore, the Bs appeared in a ring univalent formation structure that appears when the arms are engaged in a chiasmatic union, as appears to be the case here, and is usually interpreted as an indication of an isochromosome origin. Among fish species, the large B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al., 2000) and *Alburnus alburnus* (Ziegler et al., 2003) represent examples of isochromosome origin. Considering that SATA centromeric satellite could be involved with centromeric function in the cichlid chromosomes (Franck and Wright, 1992; Franck et. al., 1994), the absence of clear visible SATA satellite cluster in the Bs of *H. obliquidens* suggests that this extra element does not regularly segregate during the cell division

process, and could possibly be driving through the male or female meiosis (Burt and Trivers, 2006) as previously reported for the plant *Lilium callosum* (Kayano, 1957) and the animal *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt 1973, 1976), and other examples from grasshoppers (Camacho, 2005).

Moreover, the presence of conserved repetitive sequences between the A and B chromosomes suggests that the B element could have originated from the A genome. In the same way, the presence of 18S rRNA gene-like sequences in this accessory element indicates that its possible source might be related to st/a chromosomes of A complement that bear ribosomal genes. The st/a chromosomes bearing 18S rRNA sites also harbors repetitive DNAs that are shared with the Bs. It could have originated as an isochromosome by misdivision of a centromere followed by chromatid nondisjunction. Further chromosomal rearrangements and accumulation of repetitive DNAs could have resulted in the observed B chromosome. The symmetric distribution of 18S rDNA and repetitive sequences between the B arms also support an isochromosome origin. Alternatively, Robertsonian fusion between two acrocentric chromosomes bearing rDNA sites could account for the origin of the B chromosomes. The absence of telomeric interstitial signals in the B chromosome indeed corroborates the previous hypothesis, demonstrating that the B chromosome was not caused by a simple translocation. Another hypothesis is that the B element could have originated through the amplification and accumulation of repeated DNAs from a proto-B-chromosome that were generated from a small chromosome fragment of the A complement generated after non-disjunction during meiosis. In this way, the presence of high amount of repeated DNAs in the first chromosome pair suggests that Bs could have arisen from genomic segments of such A element. This extra element would then be freed from the selection pressures that act on the

maintenance of standard chromosomes and could have increased of size due to the accumulation of repetitive DNAs in the absence of recombination. In this way, the B could represent a repository of genetic information that could be integrated into the A chromosomes by translocation, as previously reported between the A and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil et al., 1983; Cabrero et al., 1987), leading to the diversification of genomes. In this view, B chromosomes would not always act just as a selfish element but could also contribute to the evolution of the whole genome.

Acknowledgements

The study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

A bibliografia deste trabalho se encontra listada no item **6. Referências Bibliográficas**, desta tese na página 100.

Table

Table 1 – B chromosome distribution in the analyzed *H. obliquidens* species.

Number of B per individual	Total of individuals	Male	Female	Not sexed	Percentage of the total analyzed fish
0	58	31	17	10	60.41%
1	30	10	13	07	31.25%
2	08	05	03	-	8.33%

Figure captions

Figure 1: Karyotypes of *H. obliquidens* Giemsa stained (a), silver nitrate stained (b) C-banded (c) and after FISH with DNA enriched with repetitive sequences from BAC C4E09, cloned from a *O. niloticus* genomic library. The meta-submetacentric (m/sm), the subtelo-acrocentric (st/a), and the B (1B and 2B) chromosomes are indicated. Scale bar indicates 5 μ m.

Figure 2: Metaphasic spreads of *H. obliquidens* after FISH with 5S rDNA (a), FISH with 18S rDNA (b), C-banding (c), FISH with DNA enriched with repetitive sequences from BAC-C5E01 (d), SATA satellite DNA (e) and FISH with telomeric (GGGTTA)_n DNA (f). Arrows indicate the B-type chromosomes. Scale bar indicates 5 μ m.

Figure 3: Meiotic diakinetid spreads from *H. obliquidens* testis cells: Giemsa stained with one B chromosome, not evidenced (a), C-banded with evidenced two B chromosomes (b), and after FISH with 18S rDNA probe (d and e). Arrows indicate the B-type chromosomes and (d) partially associated B chromosomes. Scale bar indicates 5 μ m.

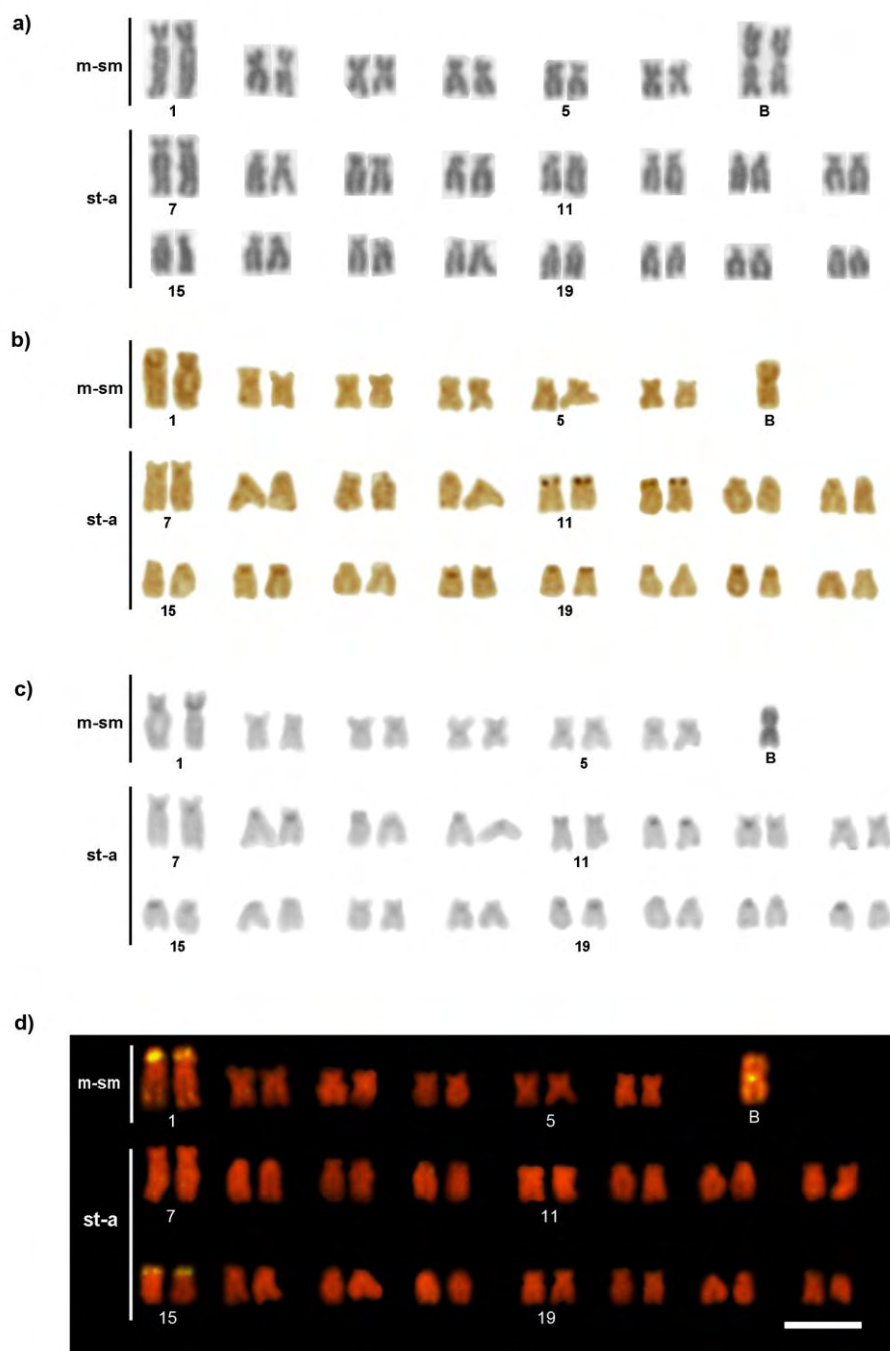


Figure 1

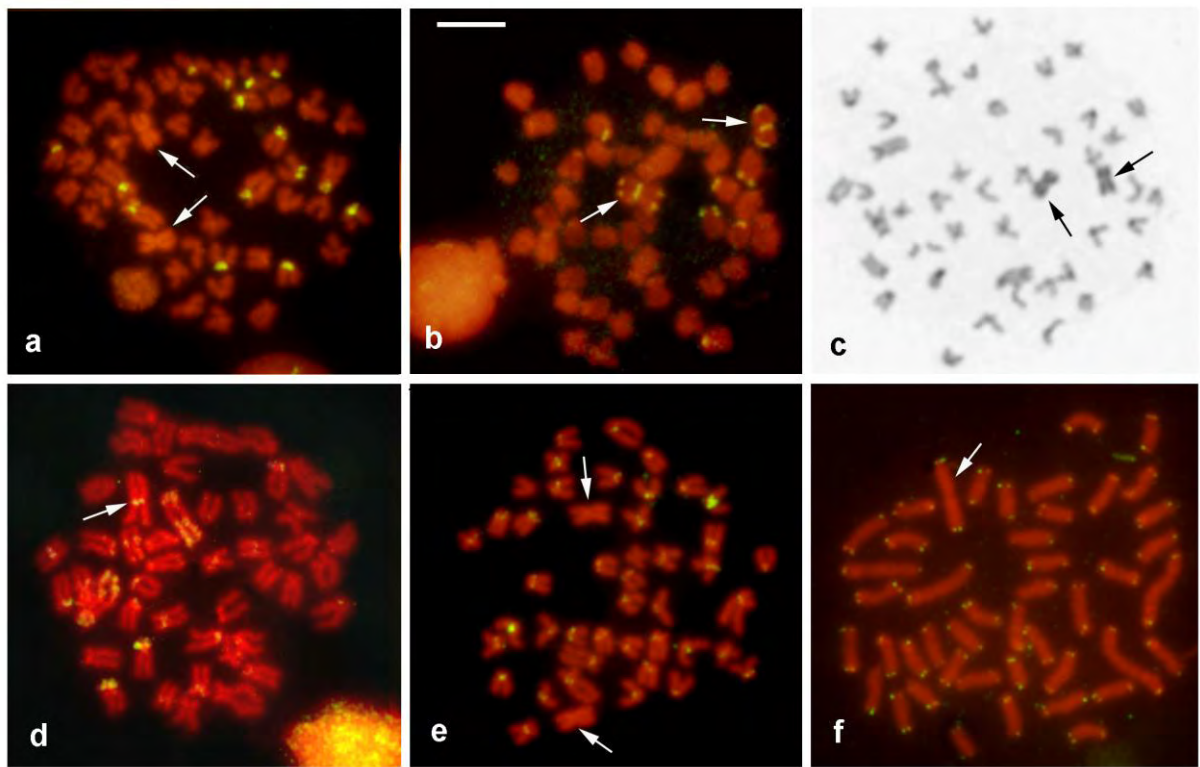


Figure 2

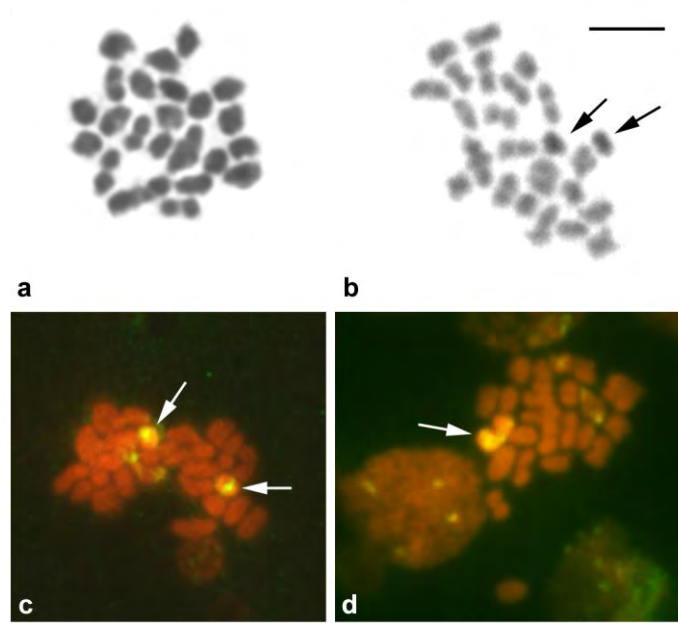


Figure 3.

4.3 CAPÍTULO III:

Female associated B chromosome in the cichlid fish *Metriaclima lombardoi*

Abstract

Individuals of the cichlid fish *Metriaclima lombardoi* were cytogenetically analyzed by Giemsa staining and C-banding for describing their karyotype and heterochromatin distribution. One B-type chromosome was detected in 50 % of the females and in none of the males. For better characterization of the karyotype and assessing the nature of the B chromosome, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was accomplished with probes containing the 18S rRNA gene, and a bacterial artificial chromosome (BAC) enriched with repeated DNA sequences of the Nile tilapia *O. niloticus*. The BAC hybridized in the small arms of the first pair of the A complement and evidenced a strong cluster in the centromeric area and scattered signals along the entire chromosome arms of the B chromosome. The B chromosome was found only in females and could have originated as an centric fragment from the first pair of the A complement and accumulated repeated DNAs as a consequence of absence of recombination. We could also hypothesize that the origin of the B element from the first chromosome pair could also have drive the sex distortion observed.

Introduction

Cichlid fishes found in the lakes of Africa are model systems for the study of evolution (Kocher, 2004). There are more than 1000 species in Lake Malawi alone, and many faunas diverged less than 50,000 years ago. Because these fishes are confined to distinct lacustrine environments and their origin is bounded by geological features, these groups provide models to study evolution (Kornfield and Smith, 2000). Their enormous diversity of trophic adaptation and behavior constitute a classical example of adaptive radiations and rapid speciation (Genner and Turner, 2005).

B chromosomes have been defined as additional dispensable chromosomes that are present in some individuals from some populations in some species, which have probably arisen from the A chromosomes but follow their own evolutionary pathway (Beukeboom, 1994). Their irregular mitotic and meiotic behavior allows them to accumulate selfishly in the germline, enabling a non-Mendelian inheritance with transmission rates exceeding those of normal chromosomes. B chromosomes have been found in all major groups of animals and plants (Camacho et al., 2000). They are usually smaller but some may be as large as or larger than A chromosomes. In morphology, Bs may exist as isochromosomes, acrocentrics or telocentrics (Dhar et al., 2002) and are mostly heterochromatic (Jones and Rees, 1982). They are usually genetically inert but may have NORs (nucleolus organizer regions), 5S rDNA and other genes that affect recombination and ensure their preferential transmission through the gametes (Beukeboom, 1994; Jones, 1995). Supernumerary chromosomes may arise by chromosomal breakage and fusion from the A chromosomal complement of a species or through hybridization between species (Camacho et al., 2000).

The occurrence of supernumerary chromosomes has been described for species of diverse fish groups. In general the supernumerary chromosomes of fishes vary in number from one to eight (Pauls and Bertollo, 1983; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Foresti et al., 1989). The size of the extra chromosome can vary greatly from macro-chromosomes as found in *Astyanax* spp. (Maistro et al., 1992; Salvador and Moreira-Filho, 1992; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Ferro et al., 2003) and *Alburnus alburnus* (Ziegler et al., 2003; Schmid et al., 2006); medium size as in *Rhamdia* sp. (Fenocchio and Bertollo, 1990; Fenocchio et al., 2000) or microchromosome, as in *Prochilodus* sp. (Pauls and Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Among cichlids, supernumerary chromosomes have been described in only a few species from South America. They were first described for male germinative cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Feldberg and Bertollo, 1984) and for species of *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis* and *Crenicichla niederleinii* (Martins-Santos et al., 1995). Supernumerary microchromosomes were also described for *Cichla monoculus*, *Cichla* sp. and *Crenicichla reticulata* (Feldberg et al., 2004). Additionally, information concerning the presence of B chromosomes among the African cichlids has just recently been reported for the haplochromine fish *Haplochromis obliquidens* (Poletto et al., in preparation).

Although distributed among different fish taxa, the genomic nature and genetic behavior of supernumerary chromosomes are still poorly understood among fishes. Since the genomes of some African cichlid species are being sequenced (The International Cichlid Genome Consortium, 2006), it is of particular interest to investigate the chromosome structure of these species. To this end, we performed

molecular cytogenetic analysis on the African cichlid fish *M. lombardoi* and detected a B-type chromosome that is only found in female genomes.

Materials and Methods

Specimens, chromosome preparation and banding

Specimens of both sexes of *M. lombardoi* (16 males and 18 females), obtained from commercial sources in Brazil, and from breeding of wild stocks (from Lake Malawi, Africa) maintained at the Tropical Fish Facility of University of Maryland, USA, were used for chromosome preparation. Metaphase chromosomes were obtained from anterior kidney cells using *in vivo* treatment with colchicines at 0.025 % (1 ml/100 g of body weight), using an air-drying method (Bertollo et al., 1978). The heterochromatin was revealed by C-banding (Sumner, 1972). The chromosomes were classified as meta/submetacentric (m/sm) and subtelo/acrocêntric (st/a), and arranged in the karyotype by decreasing size.

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

Fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed to map repeated DNAs in the chromosomes of *M. lombardoi*. The first chromosomal probe consisted of a segment of 1,400 base pairs (bp) of the 18S rRNA gene of the cichlid fish *Oreochromis niloticus*. The probe was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification with the primers 18Sf 5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT and 18Sr 5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA. These 18S primers were designed from the sequence of the catfish *Ictalurus punctatus* (GenBank accession number AF021880) and have been applied in the PCR-amplification of the 18S rRNA genes of different fish including cichlids (Cioffi et al., 2009; Teixeira et al., 2009). The second probe,

BAC-C4E09, corresponds to a BAC (bacterial artificial chromosome) clone and contains several classes of repeated elements from the *O. niloticus* genome, including LINE-like retrotransposons and satellite DNAs (Ferreira and Martins, 2008).

The probes were labeled by nick translation with biotin 14-dATP (Bionick labeling system, Invitrogen). After denaturation of the chromosomal DNA in 70 % formamide/2× SSC for 40 seconds at 70 °C, hybridization mixtures containing 100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2× SSC and 50 % formamide, in a final volume of 30 µl, were dropped on the slides and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a 2× SSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 45 °C in 2× SSC/50 % formamide for 15 min, followed by a second wash in 2x SSC for 15 min, and a final wash at room temperature in 4× SSC for 15 min. Detection of hybridized probes was carried out with 0.07 % avidin-FITC conjugate (Sigma) in C buffer (0.1 M NaHCO₃ /0.15 M NaCl) for 1 h followed by two rounds of signal amplification using 2.5% antiavidin biotin conjugate (Sigma) in blocking buffer (1.26 % NaHCO₃, 0.018 % sodium citrate, 0.0386 % triton and 1 % non-fat dried milk) for 30 min. Each treatment with anti-avidin biotin conjugate was followed by a treatment with avidin-FITC. The treatments with avidin-FITC and anti-avidin-biotin were conducted in a 2× SSC moist chamber at 37 °C. After each amplification step, the slides were washed three times for 5 min each in blocking buffer at 42 °C. Chromosomes were counterstained with propidium iodide diluted in antifade (Vectashield mounting medium, Vector). Hybridized chromosomes were analyzed using an Olympus BX 61 microscope and the images were captured with a digital camera Olympus DP70 with the software Image-Pro MC 6.0. Karyotypes and metaphases were arranged with Adobe Photoshop 7.0 software.

Results

Basic cytogenetic analysis

The specimens of *M. lombardoi* exhibited a standard karyotype of $2n=44$ chromosomes with seven metacentric/submetacentric (m/sm) pairs and 15 subtelocentric/acrocentric (st/a) pairs and showed no chromosomal differentiation between sexes (Fig. 1). The most striking characteristic observed was the presence of one large metacentric extra chromosome that was found only in females from both a commercial source in Brazil and first generation wild stocks maintained at the University of Maryland (Fig. 1). One out of five females in the samples from Brazil and eight out of 13 females of the population from United States had the extra chromosome (Table 1). None of the males analyzed showed this extra chromosome. The extra chromosome was present in 100% of the analyzed cells in the females carrying it. Constitutive heterochromatin was detected in the pericentromeric regions of most A chromosomes, in the short arms of chromosome pair one, as well as along the entire length of the B chromosome (Fig. 2a, b).

Cytogenetic mapping of repeated DNAs

Hybridization with the 18S rDNA probe identified four sites in the short arm of st/a chromosomes and no signal in the B chromosome (Fig. 2c). The chromosomal hybridization with the BAC-C4E09 showed small signals in the short arms of two st/a chromosomes and a strong cluster in the short arm of chromosome one. Furthermore, the BAC-C4E09 showed a strong cluster of hybridization in the centromeric area and scattered signals along the entire chromosome arms of the B chromosome (Fig. 2d)

B chromosome restricted to females

B chromosomes were found associated only with females in both fishes obtained from the aquarium trade in Brazil, and from a breeding stock of wild caught fish maintained at the University of Maryland. The B chromosomes have the same morphology and size among animals of both stocks. These similar characteristics suggest that the B chromosome is a natural feature of the original population in Africa and has been transmitted through female drive to subsequent generations.

It has been postulated that the presence of a B chromosome could influence the sex ratio (Burt and Trivers, 2006). The involvement of B chromosomes driving the sex ratios has been reported for several species. For example, in the characid fish *Astyanax scabripinnis*, there is a highly significant association between B chromosomes and sex, with a disproportionately high frequency of males without a B chromosome and a high frequency of females with one B (Vicente et al., 1996; Néo et al., 2000). Five intersexes were discovered, all of which had B chromosomes, so Bs may have a direct effect on the sexual phenotype (Néo et al., 2000). Another example is the fairy shrimp *Branchipus schaefferi*, in which Bs are only found in males (Beladjal et al., 2002). In insects, the wasp *Nasonia vitripennis* carries a paternal sex ratio (PSR) chromosome (Nur et al., 1988). This small B chromosome causes destruction of the entire paternal chromosome set in eggs fertilized with sperm carrying the PSR chromosome, which results in eggs containing the maternal set plus the B chromosome of the father, which then develop into males carrying the PSR chromosome (Werren, 1987).

The presence of sequences conserved between the B chromosome and the chromosome pair one suggest that the extra element could have originated from pair one. The first haplochromine chromosome pair of *M. lombardoi* is homologous to the

large chromosome pair of the *O. niloticus* complement (Ferreira et al., in preparation) that contains a high amount of repetitive sequence compared to the other chromosomes (Ferreira and Martins, 2008). Furthermore, a BAC containing a linkage group of the ZW-ZZ sex determination mechanism of *Oreochromis aureus* and *Tilapia mariae* physically maps to the first pair of *O. niloticus* (Cnaani et al., 2008). Consequently the B chromosome of *M. lombardoi* could still harbor genomic relics of the sex determining ZW-ZZ locus that are causing the female sex distortion observed.

Genomic content of the B chromosome

In the present study we analyzed *M. lombardoi* specimens from two distinct stocks. An extra large sized metacentric chromosome was found only in females of both populations. The heterochromatin of the B chromosome shows the presence of repeated DNAs, and the strong pattern of hybridization of the BAC-C4E09 sequences, which have similarities to retrotransposons and satellite DNAs of *O. niloticus* genome, reveals part of content of the B chromosome. The presence of sequences with similarities to retrotransposons in a B chromosome has been reported before for the fish *Astyanax scabripinis* (Mestriner et al., 2000) as well as for the B chromosome of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (McAllister 1995; McAllister and Werren, 1997). Retrotransposons also appears to have been involved with the transposition of chloroplast DNA into the repeat element Bd49 of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Franks et al., 1996). A large heterochromatic metacentric B chromosome enriched with repeated DNAs was found in the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* (Cichlidae, Perciformes) (Poletto et al., in preparation). Furthermore, repeated sequences were also found in the B

chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* that has one of the largest supernumerary chromosomes in all vertebrates. Similarly to the previously reported cases, in *M. lombardoi* the repeated sequences of the *O. niloticus* BAC-C4E09 hybridized throughout the B chromosome, corroborating the idea that repeated elements like transposons often accumulate in regions not subject to recombination (Zeyl and Bell, 1996). B chromosomes typically contain much higher amounts of repetitive DNA when compared to the genome from which they must have originated. This is supported by the transposable elements TRIM and TRAM which copy number in the neo-Y chromosome of male *Drosophila miranda* (which undergoes recombination) is comparable to that of the whole female genome (Steinemann and Steinemann 1991, 1992; Steinemann et al., 1993). Mobile elements may be responsible for the generation of structural variability in B chromosomes. This mode of differentiation should happen in a stepwise manner, with a B chromosome arising through the duplication of a major element followed by transposable element insertion. The autosomal region on the B chromosome could thus quickly lose homology with its parental sequence resulting in suppressed recombination between them (Camacho et al., 2000). Besides, it has been suggested that repeat family amplification may be a mechanism through which a chromosome fragment (i.e. a neo-B chromosome) may become stabilized and positively selected within a nucleus (Reed et al. 1994; Leach et al., 1995). Finally, the active genes inherited from the original progenitor elements of the B chromosomes may become silenced either by insertions of transposable elements or through disruptions in ordered chromatin structure, as shown in the silenced larval cuticle protein (*Lcp*) genes on the neo-Y chromosome of *D. miranda* (Steinemann et al., 1993).

The B chromosome of *M. lombardoi* could have originated as a centric fragment excised by fission of a chromosome from the first pair, because the repetitive elements that hybridize along the B also hybridize strongly in the smaller arms of the first pair of the A complement. In the following generations, the B element suffered an accumulation of repeated DNAs as a consequence of absence of recombination with the A chromosomes. Repeated elements are expected to accumulate in the heterochromatin, which is characterized by lower gene density and reduced recombination (Szauter, 1984). Although repetitive DNAs were long considered to be junk DNA because they had no clearly identified function (Doolittle and Sapienza 1980; Orgel et al., 1980), their accumulation in specific genomic areas can cause chromosome rearrangements through chromosome breakage, deletions, inversions and amplifications (Lim and Simmons, 1994; Dimitri et al., 1997). In this way, repetitive DNAs are emerging as major players in evolution throughout their effect in the genome (Biémont and Vieira, 2006) acting at the chromosomal level. The investigation of the repetitive DNA portion of B chromosomes will contribute to understanding the basal evolutionary mechanisms involved in the origin and evolution of such a particular chromosome.

Acknowledgements

The study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

A bibliografia deste trabalho se encontra listada no item **6. Referências Bibliográficas**, desta tese na página 100.

Table

Table 1: B chromosome distribution in the analyzed *M. lombardoi* species.

Distribution of B per individual	Analized individuals	Males	Females	Percentage of total analyzed fish
Animals with B chromosome	9	—	9	26.48%
Animals without B chromosome	25	16	9	73.52%

Figure legends

Figure 1: Karyotype of *M. lombardoi* containing seven meta/submetacentric (m/sm) and 15 subtelo/acrocentric (st/a) chromosomes, and one extra chromosome (B). Scale bar, 5 μ m.

Figure 2: Metaphasic spreads of *M. lombardoi* submitted to C-banding (a, b), and probed with 18S rRNA gene (c) and BAC-C4E09 enriched of repetitive DNAs (d). The arrow indicates the B chromosome and the arrowhead the 18S rRNA gene sites. The first (1) chromosome pair is also indicated in (a) and (d). Scale bar, 5 μ m.



Figure 1

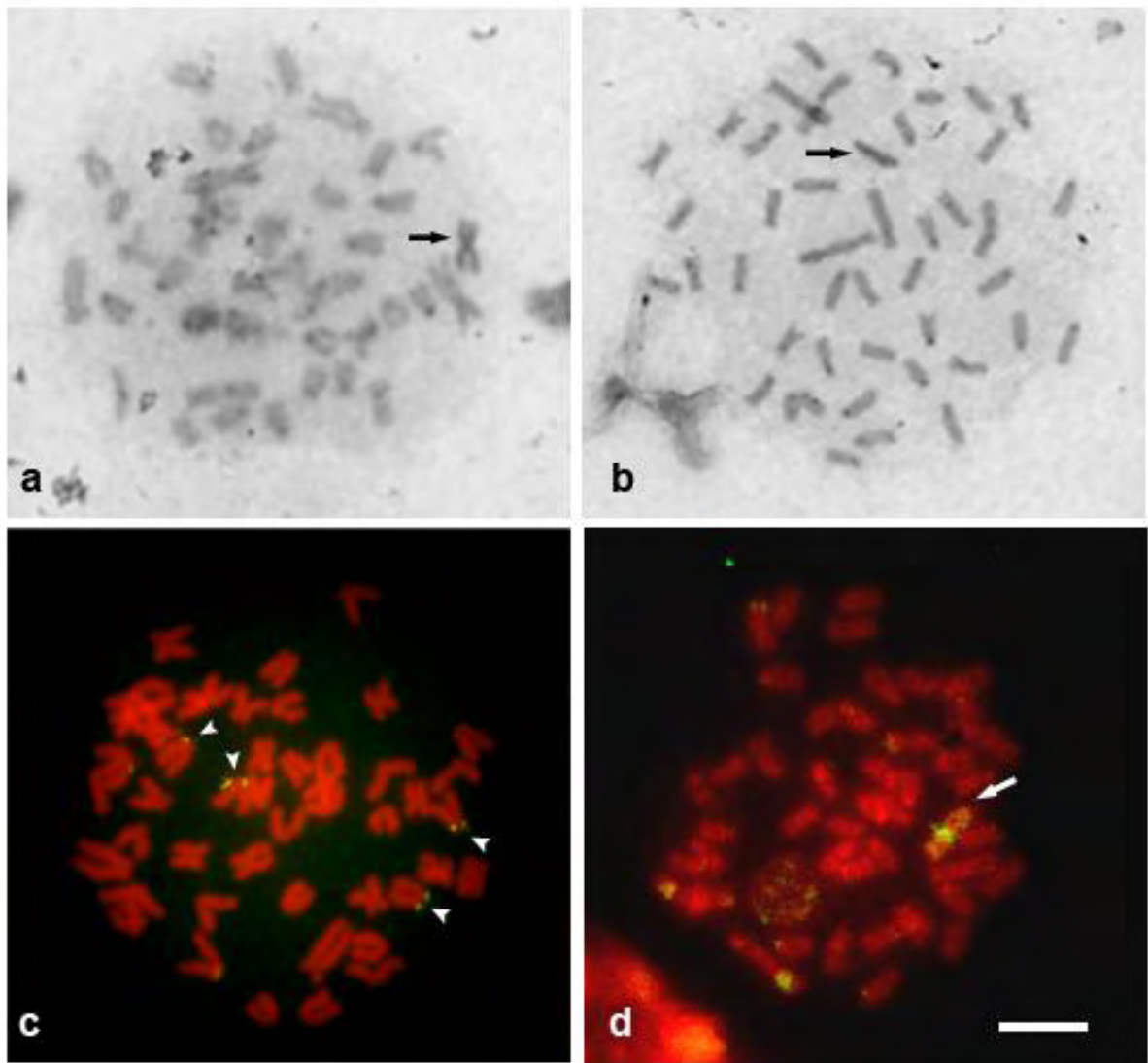


Figure 2

5. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com as análises citogenéticas realizadas na família Cichlidae pode-se concluir que:

- Os peixes da família Cichlidae apresentaram padrões específicos de variação cromossômica dentro de cada subfamília. Os ciclídeos neotropicais apresentam maior variação provavelmente devido a sua diferente história evolutiva, com taxas menores de extinção, quando comparados aos africanos, preservando assim caracteres ancestrais em alguns grupos. Os dados cromossômicos também corroboram a maior variabilidade genética encontrada nos ciclídeos neotropicais, como já havia sido relatado por outras análises genéticas.
- O padrão de maior homogeneidade cariotípica apresentado pelos africanos, em especial pelo grupo dos haplocromíneos, não retrata a grande variedade de espécies encontradas dentro desse grupo de peixes. Essa diferença pode estar relacionada aos diferentes modos de especiação, tendo os ciclídeos neotropicais passado por especiação por vicariância e os africanos por modo ecológico e por seleção sexual.
- Foram encontrados cromossomos especiais do tipo B em duas espécies de ciclídeos africanos. A explicação mais parcimoniosa é de que estes cromossomos surgiram independentemente nas duas espécies, embora tenham características comuns por serem cromossomos grandes, metacêntricos e heterocromáticos. Por outro lado possuem padrões diferenciados de hibridação de sequências repetitivas e de herança, tendo sido encontrados até dois cromossomos Bs por indivíduo em ambos os

sexos, em *H. obliquidens* e, no máximo um cromossomo apenas em fêmeas, em *M. lombardoi*. Além do mais, ambas as espécies são nativas de lagos diferentes da África, o que torna a origem comum ainda mais improvável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly IV, Molina WF: Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). *Genet Mol Res* 7:358-370 (2008).
- Affonso PR, Galetti Jr PM: Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica* 123:227-233 (2005).
- Albertson RC, Market JA, Danley PD, Kocher TD: Phylogeny of a rapidly evolving clade: The cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5107-5110 (1999).
- Allender CJ, Seehausen O, Knight ME, Turner GF, Maclean N: Divergent selection during speciation of Lake Malawi cichlid fishes inferred from parallel radiations in nuptial coloration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14074–14079 (2003).
- Almeida-Toledo L, Foresti F, Trajano E, et al: Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45:255-262 (1992).
- Axelrod HR: The most complete colored lexicon of cichlids, 2nd ed (TFH Publications, NJ, 1996).
- Azuma Y, Kumazawa Y, Miya M, Mabuchi K, Nishida M. Mitogenomic evaluation of the historical biogeography of cichlids toward reliable dating of teleostean divergences. *BMC Evol Biol* 8:215 (2008).
- Barlow GW: The Cichlid Fishes: Nature's Grand Experiment in Evolution (Perseus Publishing, Cambridge, MA 2000).
- Beladjal L, Vanderkerckhove TTM, Muyssen B, Heyrman J, de Caesemaeker J, Mertens J: B-chromosomes and male-biased sex ratio with paternal inheritance in the fairy shrimp *Branchipus schaefferi* (Crustacea, Anostraca). *Heredity* 88:356-360 (2002).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil J Genet.* 1:103-120 (1978).
- Beukeboom LW: Bewildering Bs: An impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity* 73:328-336 (1994).
- Biémont C, Vieira C: Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521-524 (2006).

- Boulenger GA: Report on the fishes recently obtained by Mr. J. E. S. Moore in Lake Tanganyika. Proc Zool Soc London, pp 494-497 (1898).
- Brum MJL, Galetti Jr P: Teleostei ground plan karyotype. J Comp Biol 2:91-102. (1997).
- Burt A, Trivers R: Genes in conflict: The biology of selfish elements (Belknap Havard, London 2006).
- Cabrero J, Alché JD, Camacho JPM: Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. Genome 29:116–121 (1987).
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukebomm LW: B-chromosome Evolution. Phil Trans R Soc Lond B 355:163-178 (2000).
- Camacho JPM: B Chromosomes, in Gregory TR (ed): The Evolution of the Genome, pp 223-286 (Elsevier, San Diego 2005).
- Carrasco LAP, Penman DJ, Bromage N: Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. Aquaculture 173: 207–218 (1999).
- Casciotta J, Arratia, G: Tertiary cichlid fishes from Argentina and reassessment of the phylogeny of new world cichlids. Kaupia 2:195–250 (1993).
- Castro J, Viñas A, Sánchez L, Martínez P: Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag- and CMA3-staining, and fluorescent in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 75:234–239 (1996).
- Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM: Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. Chrom Res 8:627-634 (2000).
- Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ: Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Chromosoma 111:45-52 (2002).
- Childs G, Maxson R, Cohn RH, Kedes L: Orphans: dispersed genetic elements from tandem repetitive genes of eukaryotes. Cell 23:651-663 (1981).
- Cichocki FP: Cladistic history of cichlid fishes and reproductive strategies of the American genera *Acarichthys*, *Biotodoma*, and *Geophagus* (Unpublished PhD Thesis, University of Michigan, Ann Arbor 1976).

- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res* 125(2): 132-141 (2009).
- Cnaani A, Hulata G: Tilapias, in Kocher TD, Kole C (eds): *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals*, vol 2, pp 101-116 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008).
- Cnaani A, Lee B-Y, Zilberman N, Ozouf-Costaz, Hulata G, et al: Genetics of Sex Determination in Tilapiine Species. *Sex Dev* 2:33-54 (2008).
- Cohen AS, Soreghan M, Scholz CA: Estimating the age of formation of lakes: an example from Lake Tanganyika, East African Rift system. *Geology* 21:511–514 (1993).
- Cohen AS, Lezzar KE, Tiercelin JJ, Soreghan M: New paleogeographic and lake-level reconstructions of Lake Tanganyika: implications for tectonic, climatic and biological evolution in a rift lake. *Basin Res* 7:107–132 (1997).
- Concheiro-Perez GA, Rican O, Ortí G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya R: Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the Cytochrome b gene. *Mol Phylogenet Evol* 43:91-110 (2007).
- Coulter GW: *Lake Tanganyika and its life* (Oxford University Press, Oxford 1991).
- D'Amours D, Stegmeier F, Amon A: Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117:455-469 (2004).
- Danley PD, Kocher TD: Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Mol Ecol* 10:1075-1086 (2001).
- Delvaux D: Age of Lake Malawi (Nyasa) and water level fluctuations. *Mus R Afr Centr Tervuren (Belg.) Dept Geol Min Rapp Ann* 1995–1996:99–108 (1995).
- Denton TE: Evolution of the fish karyotype, in Thomas CC (ed): *Fish Chromosome Methodology*, pp 129–148 (Springfield, Illinois 1973).
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS: Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111:332–340 (2002).

- Dimitri F, Arca B, Berghella L, Mei E: High genetic instability of heterochromatin alter transposition of the LINElike 1 factor in *Drosophila melanogaster* Proc Natl Acad Sci USA 94:8052-8057 (1997).
- Doolittle WF, Sapienza C: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284:601-603 (1980).
- Falquet J, Creusot R, Dron M: Molecular analysis of DNA homologous to IGS subrepeats. Plant Physiol Biochem 35:611-622 (1997).
- FAO. © 2003-2009. Fisheries Topics: Statistics. Fisheries statistics and information. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. [Cited 6 August 2009].http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/FI/5.5.23/figis/webapps/figis/temp/hqp_62409.xml&outtype=html.
- Farias IP, Orti G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A: Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. J Mol Evol 48:703-711 (1999).
- Farias IP, Orti G, Meyer A: Total evidence molecules, morphology, and the phylogeny of cichlid fishes. J Experimental Zool 288:76-92 (2000).
- Farias IP, Ortí, G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A: The Cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. J Mol Evol 53:89–103 (2001).
- Feldberg E, Bertollo LAC: Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces, Cichlidae). Rev Brasil Genet 7:639-645 (1984).
- Feldberg E, Bertollo LAC: Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). Caryologia 38(3-4):257-268 (1985a).
- Feldberg E, Bertollo LAC: Nucleolar organizing regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). Caryologia 38(3-4):319-324 (1985b).
- Feldberg E, Porto JIR, Santos EBP, Valentim FCS: Cytogenetics studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the Central Amazon. Genet Mol Biol 22:351-356 (1999).
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC: Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution, in: Val AL, Kapoor BG (eds): Fish adaptations, pp 285-308 (Science Publishers, New Dehli & New York 2003).

- Feldberg E, Porto JIR, Alves-Brinn MN, Mendonça MNC, Benzaquem DC: B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenet Genome Res* 106:195-198 (2004).
- Fenocchio AS, Bertollo LAC: Supranumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81:193-198 (1990).
- Fenocchio AS, Bertollo L.A.C, Takahashi, CS, Camacho JPM: B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biol* 48:105-109 (2000).
- Ferreira IA, Martins C: Physical chromosome mapping with repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39:411-418 (2008).
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo, LAC: B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica* 119:147-153 (2003).
- Foot DL, Wiley JE, Little ML, Meyne J: Ribosomal RNA gene polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet Cell Genet* 57:196-199 (1991).
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA: Supranumerary chromosomes systems, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sactaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107-114 (1989).
- Franck JPC, Wright JM: Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces: Cichlidae). *Genome* 36:187-194 (1992).
- Franck JPC, Kornfield I, Wright JM: The utility of SATA satellite DNA sequences for inferring phylogenetic relationships among the three major genera of tilapiine cichlid fishes. *Mol Phyl Evol* 3:10-16 (1994).
- Franks TK, Houben A, Leach CR, Timmis JN: The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 105:223-230 (1996).
- Fryer G, Iles TD: The Cichlid fishes of the great lakes of Africa: Their biology and evolution (TFH Publications, Neptune City, NJ 1972).
- Galetti Jr PM, Rasch EM: Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei: Poeciliidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 4:269–277 (1993).

- Galetti Jr PM, Mestriner CA, Monaco PJ, Rasch EM: Post-zygotic modifications and intra- and interindividual nucleolar organizing regions variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chrom Res* 3:285–290 (1995).
- Galetti PM Jr, Aguilar CT, Molina WF: An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420:55-62 (2000).
- Genner MJ, Turner GF: The mbuna cichlids of Lake Malawi: a model for rapid speciation and adaptive radiation *Fish Fish* (Oxf) 6:1-34 (2005).
- Genner MJ, Seehausen O, Lunt DH, Joyce DA, Shaw PW, Carvalho GR, Turner GF: Age of Cichlids: New Dates for Ancient Lake Fish Radiations. *Mol Biol Evol* 24(5):1269-1282 (2007).
- Goldstein RJ: *Cichlids of the world* (TFH Publications, Neptune 1988).
- Goodwin NB, Balshine-Earn S, Reynolds JD: Evolutionary transitions in parental care in cichlid fish. *Proc R Soc London Ser B* 265:2265-72 (1998).
- Gross MC, Feldberg F, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C: Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity* 102:435-441(2009).
- Harvey SC, Campos-Ramos R, Kennedy DD, Ezaz MT, Bromage NR, Griffin DK, Penman DJ: Karyotype evolution in tilapia: mitotic and meiotic chromosome analysis of *Oreochromis karongae* and *O. niloticus* × *O. karongae* hybrids. *Genetica* 115:169-177 (2002).
- Helfman GS, Collette BB, Facey DE: *The diversity of fishes* (Blackwell Science, Malden, MA 1997).
- Henriques-Gil N, Arana P, Santos JL: Spontaneous translocations between B chromosomes and the normal complement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 88:145–148 (1983).
- Hewitt GM: Evolution and maintenance of B-chromosomes. *Cromosomes Today* 4:351-369 (1973).
- Hewitt GM: Meiotic drive for B chromosome in primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera-Acrididae). *Chromosoma* 56:381-391 (1976).
- Hochberg VBM, Erdtmann B, Leistner S: Caracterização de cromossomo supranumerário ou B em Jundiás (Pisces, Pimelodidae). *Ciência e Cultura* 37:733 (1985).

- Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36:1014-1015 (1980).
- Hulsey CD: Function of a key morphological innovation: fusion of the cichlid pharyngeal jaw. *Proc Biol Sci* 273(1587):669-675 (2006).
- Johnson TC, Ng'ang'a P: Reflections on a rift lake. In: Katz BJ (ed) *Lacustrine basin exploration: case studies and modern analogs*, pp.113–135. (American Association of Petroleum Geologists Memoir, 1990).
- Johnson TC, Kelts K, Odada E: The holocene history of Lake Victoria. *Ambio* 29:2-11 (2000).
- Johnson, T.C., Scholz, C.A., Talbot, M.R., Kelts, K., Ricketts, R.D., Ngobi, G., Beuning, K., Ssemmanda, I. & McGill, J.W. Late pleistocene desiccation of Lake Victoria and rapid evolution of cichlid fishes. *Science* 273:1091-1093 (1996).
- Jones RN, Rees H: *B Chromosomes* (Academic Press, London 1982).
- Jones RN: B chromosomes in plants. (Tansley Rev No 85) *New Phytol* 131:411–434 (1995).
- Kayano H: Cytogenetic studies in *Lillium callosum* III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome. *Proc Jap Acad* 33:553-558 (1957).
- Klett V, Meyer, A: What, if Anything, is a Tilapia?—Mitochondrial ND2 Phylogeny of Tilapiines and the Evolution of Parental Care Systems in the African Cichlid Fishes. *Mol Biol Evol* 19(6):865–883 (2002).
- Kligerman AD, Bloom SE: Rapid chromosome preparation from solid tissues of fishes. *J Fish Res Board Can* 43:266-269 (1977).
- Klinkhardt M, Tesche M, Greven H: *Database of Fish Chromosomes* (Westarp Wissenschaften, Germany, 1995).
- Knight ME, Turner GF, Rico C, vanOppen MJH, Hewitt GM: Microsatellite paternity analysis on captive Lake Malawi cichlids supports reproductive isolation by direct mate choice. *Mol Ecol* 7:1605–10 (1998).
- Kocher TD. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Rev Genet* 5:288-98 (2004).
- Komiya H, Takemura S: Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *J Biochem* 86:1067-1080 (1979).
- Kornfield IL: Evidence for rapid speciation in cichlid fishes. *Experientia* 34:335-336 (1978).

- Kornfield IL: Descriptive genetics of cichlid fishes, in Turner BJ (ed): Evolutionary genetics of fishes, pp 591-616 (Plenum Press, New York 1984).
- Kornfield I, Smith PF: African cichlid fishes: Model system for evolutionary biology. *Ann Rev Ecol Syst* 31:163-96 (2000).
- Kubitza, F. 2005. Tilápia em água salobra e salgada: Uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. *Panorama da Aquicultura* 15(88):14-18.
- Kullander SO: Revision of the South American cichlid genus *Cichlasoma* (Swedish Museum of Natural History, Stockholm 1983).
- Kullander SO: A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes), in Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (eds): *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, pp 461-498 (EDIPUCRS, Porto Alegre, RS 1998).
- Kullander SO: Family Cichlidae, in Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (eds): *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*, pp 605-654 (EDIPUCRS, Porto Alegre, RS 2003).
- Leach CR, Donald TM, Franks TK, Spiniello SS, Hanrahan CF. Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 103:708-714. (1995).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220 (1964).
- Liem KF: Evolutionary strategies and morphological innovations: cichlid pharyngeal jaws. *Syst Zool* 22:425-441 (1973).
- Liem KF: Adaptive significance of intra- and interspecific differences in the feeding repertoires of cichlid fishes. *Am Zool* 20:295–314 (1980).
- Liem KF: Functional morphology, in Keenleyside MHA (ed): *Cichlid fishes: behavior, ecology and evolution*, pp. 129-150 (Chapman and Hall, London 1991).
- Lim JK, Simmons MJ: Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 16:269-275 (1994).
- Loh YH, Katz LS, Mims MC, Kocher TD, Yi S, Streelman JT: Comparative analysis reveals signatures of differentiation amid genomic polymorphism in Lake Malawi cichlids. *Gen Biol* 9:R113 (2008).
- Lohe AR, Roberts PA: An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics* 125:399-406 (1990).

- López-Fernández H, Honeycutt RL, Winemiller KO: Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *Mol Phylogenet Evol* 34:227–244 (2005).
- Lowe-McConnell RH: Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes, in: Keenleyside MHA (ed): *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution*, pp 60-85 (Chapman & Hall, London 1991).
- Lui RL, Blanco DR, Margarido VP, Moreira Filho O: First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40:552–559 (2009).
- Maina JN: The highly specialized secretory epithelium in the buccal cavity of the alkalinity adapted Lake Magadi cichlid, *Oreochromis alcalicus grahami* (Teleostei: Cichlidae): a scanning and transmission electron microscope study. *J Zool Lond* 251:427-438 (2000).
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo L.F: Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87:101-106 (1992).
- Majumdar KC, McAndrew BJ: Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon*, and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica* 68:175-188 (1986).
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O: Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 27:536–542 (2004).
- Martins C, Galetti Jr. PM: Chromosome localization of 5S rRNA genes in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363-367 (1999).
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright J: Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiini cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas* 133:39-46 (2000).
- Martins C, Galetti Jr PM: Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44(5):903-910 (2001).
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM, Foresti F: Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome:

- repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98:78-85 (2002).
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Julio Jr HF: Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia* 60:223-231 (1995).
- Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB, Julio Jr HF: Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara* cf. *dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the river Paraná PR Brazil. *Caryologia* 58:95-101 (2005).
- Mcallister BF: Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 4:253-262 (1995).
- Mcallister BF, Werren JH: Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106:243-253 (1997).
- Mesquita DR, Porto JIR, Feldberg E: Chromosomal variability in the wild ornamental fish *Symphysodon* spp. (Perciformes, Cichlidae) from Amazon. *Neo Ich* 6(2):181-190 (2008)
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JP: Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85:1-9 (2000).
- Meyer A: Ecological and evolutionary aspects of the trophic polymorphism in *Cichlasoma citrinellum* (Pisces: Cichlidae). *Biol J Linn Soc* 39:279-299 (1990a).
- Meyer A: Morphometrics and allometry of the trophically polymorphic cichlid fish, *Cichlasoma citrinellum*: alternative adaptations and ontogenetic changes in shape. *J Zool* 221:237-260 (1990b).
- Meyer A (1993) Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlids. *Trends in Ecology and Evolution* 8:279–284
- Michele JL, Takahashi CS: Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). *Cytologia* 42:535-537 (1977).
- Molina WF, Galetti Jr PM: Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol* 25:373-377 (2002).
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC: Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* 66:59-64 (2001).

- Nagl S, Tichy H, Mayer WE, Takezaki N, Takahata N, Klein J: The origin and age of haplochromine fishes in Lake Victoria, East Africa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267:1049-1061 (2000).
- Nelson JS: *Fishes of the world*, 4th ed (John Wiley and Sons, Inc. New York 2006).
- Néo D, Moreira Filho O, Camacho JPM: Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85:136-141 (2000).
- Nirchio M, Gaviria JI, Oliveira C, Ferreira IA, Martins C: Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. *Genetica* 131:135–140 (2007).
- Nur U, Werren JH, Eickbush DG, Burke WD, Eickbush TH: A 'selfish' B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 240:512–514 (1988).
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho AS: Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Braz J Genet* 11:577-624 (1988).
- Oliveira C, Saboya SMR, Foresti F, Senhorini JA, Bernardino G: Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity* 79:473-476 (1997).
- Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S: Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *Semaprochilodus laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotrop Ichthyol* 1:47-52 (2003).
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS: Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem* 35:81-100 (2009).
- Orgel LE, Crick FHC, Sapienza C: Selfish DNA. *Nature* 288:645-646 (1980).
- Oyhernart-Perera MF, Luengo JA, Brum-Zorrila N: Estudio citogenetico de *Cichlasoma facetum* (Jennyns) y *Crenicichla sexatilis* (LINN) (Teleostei, Cichlidae). *Revista Del Uruguay* 3:29-36 (1975).
- Park EH: A list of the chromosome numbers of fishes. *Coll Rev Coll Lib Arts Sci Seoul Nat Univ* 20:346-372 (1974).
- Pauls E, Bertollo LAC: Evidence for a system of supernumerary chromosome in *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36:307-314 (1983).
- Pauls E, Bertollo LAC: Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 81:117-123 (1990).

- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sc USA* 83:2934-2938 (1986).
- Pitman WC, Cande S, LaBrecque J, Pindell J: Fragmentation of Gondwana: the separation of Africa from South America, in Goldblatt P (ed): *Biology relationships between Africa and South America*, pp 15-34 (Yale University Press, New Haven 1993).
- Post A: *Apud* (1965), in Denton TE: *Fish Chromosome methodology* (Charles C. Thomas Publ., Illinois, 1973).
- Pullin RSV: Cichlids in aquaculture, in Keenleyside MHA (ed): *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution*, pp 280–309 (Chapman & Hall, New York, 1991).
- Rabinowitz PD, Coffin MF, Falvey D: The separation of Madagascar and Africa. *Science* 220:67-69 (1983).
- Reed KM, Beukeboom LW, Eickbush DG, Werren JH: Junctions between repetitive DNAs on the PSR chromosome of *Nasonia vitripennis*: association of palindromes with recombination. *J Mol Evol* 38:352-362 (1994).
- Reed KM, Phillips RB: Molecular cytogenetics analysis of the Double-CMA₃ chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenetic Cell Genetic* 70:104-107 (1995).
- Regan CT: A revision of the fishes of the South-American cichlid genera of *Cichla*, *Chaetobranchus*, and *Chaetobranchopsis*, with notes on the genera of American Cichlidae. *Ann Mag Nat Hist* 7:230-239 (1906).
- Salvador LB, Moreira-Filho O: B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69:50-56 (1992).
- Salzburger W, Meyer A, Baric S, Verheyen E, Sturmbauer C: Phylogeny of the Lake Tanganyika cichlid species flock and its relationship to the Central and East African haplochromine cichlid fish faunas. *Syst Biol* 51:113–135 (2002).
- Salzburger W, Meyer A: The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91:277-290 (2004).
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Scharl M: Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromos Res* 14:231–242 (2006).

- Schubert I, Wobus U: In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143–148 (1985).
- Seehausen O: Lake Victoria Rock Cichlids: Taxonomy, Ecology and Distribution. (Verduijn Cichlids, Zevenhuizen, 1996).
- Seehausen O, van Alphen JJM: Can sympatric speciation by disruptive sexual selection explain rapid evolution of cichlids diversity in Lake Victoria? *Ecol Lett* 2:262-271 (1999).
- Seehausen O, van Alphen JJM, Lande R: Color polymorphism and sex ratio distortion in a cichlid fish as an incipient stage in sympatric speciation by sexual selection. *Ecol Lett* 2:367-378 (1999).
- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS: Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24:625-641 (2008).
- Snoeks J, Rüber L, Verheyen E The Tanganyika problem comments on the taxonomy and distribution patterns of its cichlid fauna. In: Martens K, Goddeeris G, Coulter GW (eds) *Speciation in ancient lakes*, pp 355–372. (Schweizerbart'sche Verlagsdruckerei Stuttgart, 1994).
- Sparks JS, Smith WL: Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 20:501-517 (2004).
- Steinemann M, Steinemann S: Preferential Y chromosomal location of *TRIM*, a novel transposable element of *Drosophila miranda*, obscura group. *Chromosoma* 101:169-179 (1991).
- Steinemann M, Steinemann S: Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7591-7595 (1992).
- Steinemann M, Steinemann S, Lottspeich F: How Y chromosomes become genetically inert. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5737–5741 (1993).
- Stiassny MLJ: Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview, in Keenleyside MHA (ed): *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution*, pp. 1-35 (Chapman and Hall, London 1991).
- Stiassny MLJ, Meyer A: Cichlids of the Rift Lakes. *Scientific American* 280(2):64-69 (1999).
- Storey BC: The role of mantle plumes in continental breakup: case histories from Gondwanaland. *Nature* 377:301-308 (1995).

- Storey M, Mahoney JJ, Saunders AD, Duncan RA, Kelley SP, Coffin MF: Timing of hot spot-related volcanism and the breakup of Madagascar and India. *Science* 167:852-855 (1995).
- Streelman JT, Karl A: Reconstructing labroid evolution with single-copy nuclear DNA. *Proc Royal Soc London* 264:1011-1020 (1997).
- Streelman JT, Zardoya R, Meyer A, Karl SA: Multi-locus phylogeny of cichlid fishes: evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Mol Biol Evol* 15:798-808 (1998).
- Sullivan M, Higuchi T, Katis VL, Uhlmann F: Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesion-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* 117:471-482 (2004).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl Cell Res* 75:304-306 (1972).
- Sumner AT: Chromosome banding (Unwin Hyman, London 1990).
- Suzuki H, Kurihara Y, Kanehisa T, Moriwaki K: Variation in distribution of silver-staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*. *Mol Biol Evol* 7:271-282 (1990).
- Szauter P: An analysis of regional constraints on exchange in *Drosophila melanogaster* using recombination-defective meiotic mutants. *Genetics* 106:45-71 (1984).
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Poletto AB, Venere PC, Martins C: Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Res* 125:224-234 (2009).
- The international cichlid genome consortium: Genetic basis of vertebrate diversity: the cichlid fish model. Available at <http://hcgs.unh.edu/cichlid/> (2006).
- Thompson KW: Some aspects of chromosomal evolution of the Cichlidae (Teleostei: Perciformes) with emphasis on Neotropical forms (Unpublished Ph.D. Dissertation, University of Texas at Austin 1976).
- Thompson KW: Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia* 1979: 679-691 (1979).
- Thompson KW: Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces: Perciformes). *Experimentia* 37:351-352 (1981).

- Trewavas E: Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia* (British Museum, Natural History, London 1983).
- Turner GF, Seehausen O, Knight ME, Allender CJ, Robinson RL: How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol Ecol* 10:793–806 (2001).
- Turner GF: Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biol* 17(19):R827-31 (2007).
- Van Oppen M, Turner G, Rico C, Robinson R, Deutch J, et al: Assortative mating among rock-dwelling cichlid fishes supports high estimates of species richness from Lake Malawi. *Mol Ecol* 7:991-1001 (1998).
- Vences M, Freyhof J, Sonnenberg R, Kosuch J, Veith M: Reconciling fossils and molecules: Cenozoic divergence of cichlid fishes and the biogeography of Madagascar. *J Biogeogr* 28:1091-1099 (2001).
- Venere PC, Miyazawa C, Galetti Jr. PM: New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genet Mol Biol* 22:345-349. (1999).
- Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A: Origin of the Superflock of Cichlid Fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science* 300:325-329 (2003).
- Vervoot A: The karyotypes of seven species of *Tilapia* (Teleostei: Cichlidae). *Cytologia* 45:651- 656 (1980).
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia* 59:260-266 (2006).
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JPM: Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic Cell Genet* 74:70-75 (1996).
- Werren JH: The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J Theor Biol* 124:317-334 (1987).
- Wilkes TM, Francki MG, Langridge P, Karp A, Jones RN, Forster JW. Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Res* 3:466-472 (1995).
- Won Y-J, Sivasundar A, Wang Y, Hey J: On the origin of Lake Malawi cichlid species. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6581-6586 (2005).
- Won Y-J, Wang Y, Sivasundar A, Raincrow J, Hey J: Nuclear gene variation and molecular dating of the cichlid species flock of Lake Malawi. *Mol Biol Evol* 23:828-838 (2006).

- Zeyl CW, Bell G: Symbiotic DNA in eukaryotic genomes. Trends Ecol Evol 11:10-14 (1996).
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharf M, Schmid M: The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. Chromos Res 11:23-35 (2003).