# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura

LEILA BRAGA RIBEIRO

Manaus, Amazonas
Outubro, 2013

**LEILA BRAGA RIBEIRO** 

Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos

em Colossoma macropomum

(Characiformes,

Serrasalmidae) associado à piscicultura

Orientador: Dra. Eliana Feldberg

Coorientadora: Dra. Daniele Aparecida Matoso

Tese apresentada ao Instituto Nacional

de Pesquisas da Amazônia como parte

dos requisitos para obtenção do título

de Doutor em Genética, Conservação e

Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Outubro, 2013

ii

# FICHA CATALOGRÁFICA

#### Sinopse

Colossoma macropomum, espécie conhecida popularmente como tambaqui, foi analisada citogeneticamente por meio de técnicas de citogenética clássica (coloração convencional, localização da heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolo) e molecular, com a utilização da hibridização fluorescente in situ de sequências repetitivas (em tandem e dispersas). Observou-se que a distribuição e variação na quantidade de elementos transponíveis podem estar envolvidas na adaptação desses animais a diferentes ambientes, subsidiando ações que envolvam a utilização desses elementos como via de melhoramento genético em espécies de interesse comercial.

Palavras-chave: Tambaqui, sequências repetitivas, elementos transponíveis, híbrido, FISH.

# R484 Ribeiro, Leila Braga.

Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura / Leila Braga Ribeiro. --- Manaus : [s.n.], 2013. xiv, 91 f. : il. color.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2013.

Orientador: Eliana Feldberg.

Coorientador: Daniele Aparecida Matoso.

Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Tambaqui. 2. Piscicultura. 3. Mapeamento cromossômico. I. Título.

CDD 597.5

Dedico esta tese a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, especialmente à minha família e aos meus sobrinhos Miguel e Raquel.

"Estamos cercados por infindáveis formas belíssimas e fascinantes, e não é por acidente, e sim uma consequência direta da evolução pela seleção natural não aleatória – única na vida, o maior espetáculo da Terra."

Richard Dawkins

# A realização deste estudo foi possível devido:

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao programa de pósgraduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) e ao laboratório de Genética Animal (LGA).

Aos financiamentos fornecidos pelo Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2) e pelos Projetos "Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais" – (Pronex/FAPEAM/CNPq 003/2009- Processo: 653:2009); "Mapeamento físico cromossômico associado à piscicultura de tambaqui: elementos transponíveis como ferramenta" – (MCT/CNPq 14/2009 – Processo: 475943: 2009-0) e "Mapeamento cromossômico e caracterização de DNAs repetitivos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) de piscicultura" - Edital N.021/2011 - UNIVERSAL AMAZONAS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e pela taxa de bancada (processo. 141660/2009-0) durante a realização deste estudo.

# **Agradecimentos**

Ao longo de quatro anos inúmeras pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, e sou grata a todas elas. Entretanto, algumas merecem um agradecimento especial...

Agradeço a minha orientadora, Dra. Eliana Feldberg, por ter me acolhido tão bem desde a época do mestrado. Obrigada pela confiança depositada em mim nesses seis anos, pela atenção dedicada, pelo exemplo profissional e sobretudo pela amizade.

À minha coorientadora Dra. Daniele Aparecida Matoso, por ter aceitado o convite de trabalhar nessa tese. Obrigada por contribuir na minha formação desde a época da graduação, pela atenção e todas as considerações feitas.

Ao Dr. Roberto Ferreira Artoni, meu primeiro orientador, por permitir meu contato com a pesquisa e me apresentar a citogenética de peixes. Obrigada pelas oportunidades dadas e pelas contribuições em parte desse trabalho.

Ao Alexandre Honczaryk, por permitir livre acesso à sua piscicultura para a realização do trabalho de campo e ao técnico Arnóbio Augusto, que gentilmente me acompanhou nessa etapa.

Aos colegas da época de universidade, em especial ao Americo Moraes Neto, pela amizade à distância e também pela contribuição nesse projeto.

Aos colegas que passaram e aos que permanecem no Laboratório de Genética Animal do INPA: Dr. Jorge Porto, Carlos, Leandra, Natália, Lucas, Cacá, Eduardo, Denise, Masseo, Marajó, Patrik, entre outros. Obrigada pelos momentos de discussão acadêmica, pelas risadas e pelas festinhas no laboratório.

À Dra. Maria Claudia Gross, por ser praticamente mais uma orientadora, por todo auxílio prestado, pelas opiniões e correções sempre muito sensatas, por ser essa profissional admirável e pela amizade.

Aos amigos "polacos" (Carlos, Claudia e Leandra), pela companhia em coletas e ajuda em laboratório, pelas comilanças, pelas conversas "jogadas fora" e por todas as risadas. Vocês fazem muita falta no laboratório.

Ao "negão" Edson Junior do Carmo, pela amizade desde a época do mestrado, pela paciência que tem comigo, pela ajuda quando precisei, pelas mensagens de madrugada em dias de insônia, e por todas as bobagens que me fazem rir e deixam meu dia mais feliz.

Às amigas de infância Deborah e Glauce, que mesmo com essa distância absurda continuam se fazendo presentes e me incentivando em cada etapa. É muito importante continuar recebendo o carinho de vocês.

Às amigas Carol e Bárbara, Karen e Kathyuscya, Mariana e Zizi. Meninas, obrigada pelas conversas (sérias ou não), por me acompanharem em inúmeros sambas e por todos os momentos de diversão.

À Carolina Noronha e à Mariana Trindade, por serem "pau pra toda obra". Sou grata pelos momentos de descontração, pelos dias de gordices, por me ouvirem nas horas difícieis, pela preocupação e cuidado que têm comigo. Contar com a amizade de vocês faz minha estada em Manaus mais agradável. Amigas, adoro vocês!

Ao Sr. Agenor Noronha por me "adotar" em diversas ocasiões, por permitir que eu conhecesse lindos lugares e pelo feijão com gosto de "casa de mãe" que me permite filar.

A todos os colegas e "beliscos" que conheci nesse período, em especial ao WPS que, apesar de tudo, acompanhou boa parte dessa jornada. Obrigada por ressurgir em horas que precisei, por me incentivar e "puxar minha orelha" quando necessário. Valeu pela paciência em aturar minha TPM e minhas crises de choro, que aliás, eu sei que detesta.

Aos meus pais, Dália e Antônio (*in memorian*), por me darem estrutura famíliar, valores e educação. Hoje percebo como são importantes os ensinamentos que recebi quando criança.

Aos meus irmãos Cátia, Leidi e Pedro (*in memorian*) que sempre cuidaram de mim com muito carinho. Cá e Le, vocês sabem que as considero minhas "irmães" e que o zelo que tiveram por minha educação permitiu que chegasse até aqui.

Ao meu cunhado Paulo, por toda consideração e carinho que tem por mim, por todas as idas ao aeroporto de Guarulhos, por cuidar da nossa família, e claro, por contribuir na geração dos meus sobrinhos.

Aos meus sobrinhos Miguel e Raquel, que pelo simples fato de existirem me motivam e dão sentido a cada conquista, e que, acima de tudo fazem que nossa família seja mais feliz. A tia ama vocês, malcriados!

Enfim, à minha família e agregados (João e família, Nilson e Silviane, Gisele, D.Cida, D. Jurema, Seu Dito e etc.), por respeitarem minhas escolhas e torcerem pelo meu sucesso. Ser querida por vocês é fundamental para suportar essa distância e acreditar que tudo é por uma boa causa. Contar com esse apoio foi essencial para essa conquista. Obrigada!

#### Resumo

Colossoma macropomum (tambaqui) pertence à família Serrasalmidae, que inclui diversos peixes de interesse comercial. Embora tenha uma boa adaptabilidade ao cativeiro, esta espécie diminui sua taxa de sobrevivência quando criada em temperaturas abaixo dos 25 °C, o que pode gerar prejuízos aos piscicultores. Diante disso, por meio de ferramentas de citogenética clássica e molecular, foi realizado o mapeamento cromossômico de seguências repetitivas em tandem e dispersas no tambaqui, outros serrasalmídeos e do híbrido tambacu, resultante do cruzamento entre C. macropomum e P. mesopotamicus. Para isso foram analisados 66 espécimes de C. macropomum oriundos de piscicultura e três capturados em ambiente natural, quatro espécimes de Mylossoma aureum, 13 de M. duriventre capturados em ambiente natural, 16 de Piaractus mesopotamicus e sete tambacus provenientes de piscicultura. O número diploide foi igual a 54 cromossomos com dois braços em todos os indivíduos, entretanto variações nas fórmulas cariotípicas foram observadas entre as espécies. Sítios de DNAr 5S foram detectados em dois pares cromossômicos em todas as espécies analisadas; entretanto, nem todos os pares foram considerados homeólogos. O mapeamento do DNAr 18S realizado em C. macropomum e P. mesopotamicus apresentou seis e quatro sítios, respectivamente. A hibridização com sondas teloméricas mostrou marcações nas porções terminais de todos os cromossomos das quatro espécies, com marcação intersticial em apenas um par cromossômico do tambaqui. O mapeamento dos elementos transponíveis Rex3 e Rex6, dos DNAr 18S e 5S no híbrido e nas espécies parentais permitiu verificar a organização genômica das mesmas e o uso dos DNAs ribossomais como marcadores cromossômicos para o tambacu, permitindo com segurança diferenciá-lo das espécies parentais. Em relação à banda C, todas as espécies e o tambacu apresentaram blocos heterocromáticos distribuídos principalmente em porções centroméricas. A localização cromossômica dos elementos móveis Rex3 e Rex6 em C. macropomum, P. mesopotamicus e no híbrido mostrou um aumento no número de cópias de Rex nos híbridos, que pode ser equivalente ao processo de disgenesia do híbrido, ainda não relatado para peixes. Os exemplares de C. macropomum que foram aclimatados a 22 °C mostraram um aumento na quantidade de blocos heterocromáticos, assim como um aumento de marcações de Rex1 e Rex6. Acredita-se que o surgimento de blocos heterocromáticos seja uma resposta epigenética à diminuição de temperatura, uma vez que regularia a expressão de sequências em regiões heterocromáticas e daria uma resposta adaptativa rápida à situação de estresse. Além disso, o surgimento de porções heterocromáticas também pode estar relacionado com aumento na quantidade dos elementos transponíveis Rex1 e Rex6, já que a formação de heterocromatina é um mecanismo conhecido para reprimir a transposição de elementos móveis. A variação nos padrões de distribuição de heterocromatina e elementos transponíveis pode ser vista como um ponto de partida para práticas de melhoramento genético do tambagui envolvendo a manipulação de elementos transponíveis, uma vez que gera dados sobre o comportamento dessas sequências em condições estressantes para o tambagui.

#### Abstract

Serrasalmidae family is composed by a number of commercial interest species, such as Colossoma macropomum and Piaractus mesopotamicus, which are used in aquaculture programs for tambacu hybrid generation. Tambaqui, is one of the most used fishes in aquaculture programs in Brazil. Although well adapted to captivity, this species reduces its survival rate when raised in temperatures below 25 °C. In this context, this work investigated the localization of 18S and 5S rDNA and telomeric sequences in Colossoma macropomum, Mylossoma aureum, M. duriventre, and Piaractus mesopotamicus; the localization of Rex3 and Rex6 transposable elements in the hybrid and parental species and explored the genomic organization of 18S and 5S rDNA, and checked correlations between the alteration in repetitive elements of Rex family physical localization in the chromosome and temperature variations in C. macropomum. The diploid number encountered in all of the species was 54 chromosomes with two arms, although variations of the karyotypic formula have been observed. C-banding demonstrated similar patterns among the analyzed species, with heterochromatic blocks being distributed mainly in centromeric regions, with an increase in the quantity of heterochromatic blocks in Colossoma macropomum acclimated at 22 °C. The 18S rDNA mapping of the species C. macropomum and P. mesopotamicus demonstrated multiple sites of this ribosomal gene; 5S rDNA sites were detected in two chromosome pairs in all of the analyzed species, although not all of those pairs were considered homeologs. 18S rDNA mapping showed that the hybrid possesses 5 sites of this sequence, which means that 18S rDNA mapping is efficient for cytogenetic identification of the tambacu hybrid and allows its effective differentiation from parental species and from the C. macropomum and P. brachypomus hybrid. Hybridization with telomeric probes revealed markings predominately in chromosomes terminal portions of all analyzed species. Only C. macropomum presented one pair with interstitial telomeric sequences. Chromosomal localization of Rex3 and Rex6 mobile elements in C. macropomum, P. mesopotamicus and in their hybrid is important for producing data on such mobile elements, especially because the increase of Rex copy number observed in hybrids may be indicative of hybrid dysgenesis, which has not yet been established in fish. Rex1 and Rex6 retrotransposons presented a distribution pattern predominately dispersed, present both in heterochromatin and euchromatin. In the animals kept at 22 °C it was seen an increase in the number of markings, which were distributed through almost the entire extension of some chromosomes. It is believed that this heterochromatic blocks increase is an epigenetic response to the temperature reduction, once it would regulate the expression of sequences in heterochromatic regions and would give a fast adaptative response to the stressing condition. Variation in heterochromatin and transposable elements distribution patterns may be seen as a starting point to practices aiming at tambagui genetic improvement involving transposable elements manipulation.

# Sumário

| 1. Introdução  | 1           |
|--|-------------|
| 1.1 Aspectos ecológicos e econômicos do tambaqui   | 1           |
| 1.2 Importância da citogenética na piscicultura  | 1           |
| 1.3 DNAs repetitivos   | 3           |
| 1.3.1 Elementos transponíveis  | 7           |
| 1.5 Objetivos  | 10          |
| 1.5.1 Objetivo geral   | 10          |
| 1.5.2 Objetivos específicos  | 10          |
| 2. Material e Métodos  | 11          |
| 2.1 Material e delineamento experimental   | 11          |
| 2.2 Métodos  | 13          |
| 2.2.1 Indução de mitoses   | 13          |
| 2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos  | 13          |
| 2.2.3 Cultura de linfócitos  | 14          |
| 2.2.4 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)  | 15          |
| 2.2.5 Detecção da Heterocomatina Constitutiva (Banda C)  | 16          |
| 2.2.6 Extração de DNA  | 16          |
| 2.2.7 Isolamento de sequências repetitivas por PCR (Polymerase Chain I   | Reaction)17 |
| 2.2.8 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência – FISH   | 19          |
| 3. Resultados e discussão  | 22          |
| 3.1 – Capítulo I: Mapeamento cromossômico de sequências repetit espécies de serrasalmídeos (Pisces, Characiformes) | •           |
| 3.1.1 – Resumo   | 24          |
| 3.1.2 - Introdução   | 24          |
| 3.1.3 - Material e Métodos   | 26          |
| 3 1 4 - Resultados   | 28          |

| 3.1.5 - Discussão   | 35        |
|---|-----------|
| 3.2 – Capítulo II: Diagnóstico citogenético molecular para o manejo o Tambacu (Colossoma macropomum x Piaractus mesopotamicus)                                      |           |
| 3.2.2 - Introdução  | 43        |
| 3.2.3 - Material e Métodos  | 47        |
| 3.2.3 – Resultados  | 49        |
| 3.3.5 – Discussão   | 53        |
| 3.3 - Capítulo III: Localização cromossômica dos retroelementos Rex1, Re<br>em Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalmidae) subn<br>diferentes temperaturas. | netidos a |
| 3.3.2 – Introdução  | 60        |
| 3.3.3 – Material e Métodos  | 62        |
| 3.3.4 – Resultados  | 64        |
| 3.3.5 – Discussão   | 66        |
| 4. Conclusões Gerais  | 71        |
| 5. Referências Bibliográficas   | 72        |

# Lista de Figuras

# **Material e Métodos**

| Figura 1: a) Reprodutores acondicionados em tanques; b) Ovócitos sendo             |
|--|
| extrusados em bandeja plástica; c) Processo de hidratação dos ovos; d) Incubadoras |
| para eclosão e desenvolvimento das larvas12  |
| Capítulo 1   |
| Figura 1: Cariótipos de C. macropomum a) Coloração convencional, e) Banda-C; P.    |
| mesopotamicus b) Coloração convencional, f) Banda-C; M. aureum c) Coloração        |
| convencional, g) Banda-C, e M. duriventre d) Coloração convencional, h) Banda-C;   |
| RONs em destaque35   |
| Figura 2: Cariótipos mostrando sítios de DNAr 18s (vermelho) e DNAr 5s (verde). a) |
| C. macropomum e b) P. mesopotamicus  |
| Figura 3: Pares cromossômicos mostrando a co-localização de alguns sítios          |
| DNAr5S e blocos heterocromáticos. a) C. macrompomum, b) P.mesopotamicus, c)        |
| M. aureum e d) M. duriventre   |
| Figura 4: Metáfases evidenciando o padrão de hibridização com sondas teloméricas   |
| (vermelho). Flechas indicando ITS. a) C.macropomum, b) M. aureum, c) M.            |
| duriventre e d) P. mesopotamicus   |
| Capítulo 2   |
| Figura 1: Cariótipo do tambacu. a) Coloração convencional em Giemsa; b)            |
| Bandamento C sequencial; em destaque os cromossomos portadores da                  |
| RON52  |

| Figura 2: Mapeamento do DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). a) Metáfase do   |
|---|
| tambacu; b) pares cromossômicos marcados pela FISH em Colossoma                 |
| macropomum; c) Em Piaractus mesopotamicus 53                                    |
| Figura 3: Metáfases mostrando a distribuição dos elementos retrotransponíveis   |
| Rex3 (vermelho) e Rex6 (verde). a) Colossoma macropomum; b) Piaractus           |
| mesopotamicus; c) Tambacu   |
| Capítulo 3  |
| Figura 1: Metáfases de C. macropomum aclimatados em diferentes temperaturas.    |
| Indivíduos mantidos a 28°C: a) Bandamento C, b) FISH com sonda Rex1 (vermelho), |
| c) Double FISH com sondas Rex3 (vermelho) e Rex6 (verde); Indivíduos mantidos a |
| 30°C: d) Bandamento C, e) FISH com sonda Rex1 (vermelho), f) Double FISH com    |
| sondas Rex3 (vermelho) e Rex6 (verde); Indivíduos mantidos a 22°C: g)           |
| Bandamento C, h) FISH com sonda Rex1 (vermelho), i) Double FISH com sondas      |
| Rex3 (vermelho) e Rex6 (verde). Cabeças de seta indicam blocos heterocromáticos |
| e setas brancas apontam sítios de   |
| Rex669  |

# 1. Introdução

# 1.1 Aspectos ecológicos e econômicos do tambaqui

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) pertence à ordem Characiformes e à família Serrasalmidae, que abrange cerca de 80 espécies válidas, embora muitas delas com taxonomia ainda incerta (Jégu 2003; Nelson 2006). Além do tambaqui, a família Serrasalmidae inclui outras espécies de interesse comercial, tais como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (Araújo-Lima e Goulding 1998; Santos *et al.* 2006).

Colossoma macropomum inclui indivíduos de grande porte, os quais podem atingir mais de 1m de comprimento total e cerca de 30kg (Araújo-Lima e Goulding 1998; Dairiki e Silva 2011). Possui corpo alto, romboidal, lábios grossos, dentes molariformes, ausência de espinho pré-dorsal e nadadeira adiposa com raios (Santos et al. 2006). Distribui-se naturalmente nas bacias amazônica e do Orinoco, onde é comum nos lagos de várzea. Sua ocorrência natural foi descrita para Bolívia, Colômbia, Venezuela, Peru e Brasil, mas é amplamente encontrada em estações de piscicultura por toda América do Sul (Jégu 2003). Apresenta maturidade tardia quando comparada a outras espécies amazônicas, com idade média dos indivíduos sexualmente maduros entre 3 e 4 anos, quando atingem cerca de 55 cm (Araújo-Lima e Goulding 1998; Santos et al. 2006). A comercialização de peixes jovens, abaixo dos 55 cm é danosa ao potencial reprodutivo da espécie, pois reduz o estoque desovante (Araújo-Lima e Goulding 1998) e diminui o lucro dos pescadores. Devido à exploração, seja ela na pesca tradicional ou mesmo no ecoturismo, existe uma preocupação dos órgãos ambientais com a saúde das populações naturais do tambaqui, a ponto desses indivíduos serem beneficiados com uma instrução normativa específica, com defeso de 1º de dezembro a 28 de fevereiro, período que corresponde aproximadamente à época em que os adultos estão realizando migrações reprodutivas, embora a antecipação desse período possa ocorrer (Ruffino *et al.* 2006).

O tambaqui é um peixe de hábito alimentar onívoro, mas sua preferência é por frutos e sementes (Araújo-Lima e Goulding 1998). Além disso, é o único peixe de grande porte da Amazônia que possui rastros branquiais longos e dentes molariformes fortes, sendo esta combinação anatômica uma característica singular que permite que o mesmo se alimente tanto de zooplâncton quanto de frutos e sementes produzidos nas florestas inundáveis (Araújo-Lima e Goulding 1998; Santos et al. 2006). Em 2003, estimou-se a existência de 411 pisciculturas no Amazonas voltadas para a criação de tambaqui, pirarucu (A. gigas) e matrinxã (Brycon amazonicus). Ainda, no estado destaca-se a Estação de Piscicultura de Balbina, a maior de toda a região amazônica, localizada no Município de Presidente Figueiredo, e pisciculturas menores localizadas em Manaus, Itacoatiara e Rio Preto da Eva (Araújo-Lima e Goulding 1998; Dairiki e Silva 2011). Atualmente observa-se uma tendência nacional no aumento do número de produtores de tambaqui, pois de acordo com os dados estatísticos de produção de tambaqui no país, pode-se observar um contínuo crescimento nos últimos anos, com um crescimento de 123% na produção entre os anos de 2003 e 2009, com média anual de 14% (Dairiki e Silva 2011).

Devido o interesse comercial pela espécie, vários estudos têm sido realizados com *Colossoma macropomum*, incluindo análises genéticas (Santos *et al.* 2007; Santos *et al.* 2009), manipulação genética para obtenção de híbridos e poliplóides

(Almeida-Toledo *et al.* 1987; Toledo-Filho *et al.* 1994; Nirchio *et al.* 2003); análises acerca de adaptações fisiológicas (Almeida-Val *et al.* 1991; Matsuo e Val 2007); estudos de manejo em cativeiro (Silva *et al* 2007; Gomes e Silva 2009); efeitos da pesca (Silvano *et al.* 2009) e estudos parasitológicos e reprodutivos (Araújo-Lima e Goulding 1998).

# 1.2 Importância da citogenética na piscicultura

A citogenética constitui uma ferramenta importante para técnicas de aquicultura, uma vez que apenas com a determinação do número diploide é possível prever se há chances de se ter sucesso na produção de híbridos. Um exemplo disso reside nos cruzamentos realizados entre *Ictalurus catus* (bagre branco) e *I. furcatus* (bagre azul), que resulta em muitos híbridos anormais. Com a determinação do cariótipo dessas espécies foi possível entender que esta dificuldade em se obter descendentes saudáveis é causada por diferenças no número e na morfologia dos cromossomos, sendo que *I. catus* possui um número diploide igual a 48 e *I. furcatus* um 2n = 58 cromossomos (Dunham *et al.* 2001).

A produção de peixes triploides ou tetraploides por manipulação cromossômica é outra metodologia amplamente aplicada na piscicultura e testada em algumas espécies como *lctalurus punctatus*, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e algumas espécies de tilápia (*O. niloticus* e *O. mossambicus*), visando indivídos maiores, crescimento mais rápido na época reprodutiva e em alguns casos maior expectativa de vida (Pérez 1996; 2006).

Espécies com sistemas de determinação sexual diferenciados podem resultar em populações com apenas um sexo, como observado em tilápias na produção de "machos puros". Algumas espécies de tilápias apresentam um sistema sexual do

tipo XX/XY (*Oreochromis mossambicus* e *O. niloticus*), enquanto outras possuem o sistema ZZ/ZW (*O. hornorum*, *O. aureus*, *O. varuabilis* ou *O. macrochir*). Para se obter uma prole composta somente por híbridos machos o cruzamento é realizado apenas entre exemplares dos sexos homogaméticos (Pérez 2006). Além da obtenção de proles monosexuais esse tipo de manipulação cromossômica também é aplicada para criar indivíduos com genomas completos provenientes da fêmea (ginogênese) ou apenas do macho (androgênese) (Pérez 2006).

Na espécie *Colossoma macropomum* alguns estudos citogenéticos já foram realizados. A partir da década de oitenta, foram produzidos diversos híbridos entre tambaqui e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com a finalidade de inserção dos híbridos na piscicultura. Estudos citogenéticos foram conduzidos por Toledo-Filho *et al.* (1994) em ambas as espécies para caracterização do número diploide como também para monitorar o resultado destes cruzamentos. Com relação ao número diplóide, as duas espécies parentais apresentam cariótipos indistinguíveis com 2n=54 cromossomos, sendo formados por 20 cromossomos metacêntricos e 34 submetacêntricos. Porém, analisando a heterocromatina constitutiva da geração F1, ficaram evidentes cinco cromossomos com padrão de bandamento diferenciado, o que permitiu identificar os genomas parentais. Ainda, resultados mais refinados como o estudo por microscopia eletrônica do complexo sinaptonêmico, sugeriram a existência de espermatogênese anômala nos híbridos, o que poderia inviabilizar a formação de gametas geneticamente funcionais.

Na citogenética de peixes a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) tem se revelado uma ferramenta eficaz por permitir a identificação de sequências específicas no DNA, levando a novas inferências a cerca da diversidade cariotípica,

bem como sobre a organização genômica de segmentos cromossômicos (Galetti Jr e Martins 2004). Marcadores genéticos baseados em DNA vêm sendo desenvolvidos para uso em espécies de interesse comercial, e nesse contexto têmse diversos estudos envolvendo o isolamento e mapeamento de sequências repetitivas (Wright 1989; Franck *et al.* 1992; Franck e Wright 1993; Franck *et al.* 1994; Oliveira e Wright 1998; Martins *et al.* 2000, 2002; Chew *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2003, Nakayama *et al.* 2012; Ruiz-Silva 2012).

# 1.3 DNAs repetitivos

Em eucariotos são encontrados dois tipos de DNA altamente repetitivos: sequências de DNA repetitivas dispersas e sequências de DNA repetidas em tandem. As sequências de DNA repetidas em tandem incluem os DNA satélites, enquanto as sequências repetitivas dispersas englobam os elementos transponíveis (Phillips e Reed 1996; Martins 2007). Os DNA satélites consistem em múltiplas cópias de unidades repetidas em tandem que possuem de 100 a 300 pares de bases. Compõem as regiões heterocromáticas detectadas pela técnica de bandamento C e estão localizadas principalmente em regiões centroméricas e teloméricas (Martins *et al.* 2004; Martins 2006). O DNA telomérico é composto por repetições em tandem de 5-8pb, ricas em bases GT. Os vertebrados compartilham uma sequência telomérica comum (TTAGGG)n, entretanto as variações quanto ao número de repetições são consideradas marcadores espécie-específicos (Martins *et al.* 2004).

Outros tipos de DNA repetitivos compostos de repetições em tandem são as sequências repetitivas de DNA ribossomal (DNAr). Estudos envolvendo essas sequências têm ganhado destaque principalmente na relação entre espécies ou

caracterização de populações, relações evolutivas e estrutura do genoma (Martins *et al.* 2004). Em eucariotos superiores os genes de RNA ribossomal (RNAr) são organizados em duas famílias multigênicas distintas. Uma classe é representada pelo DNAr 45S, que consiste em uma unidade transcricional que codifica para os RNA 18S, 5,8S e 28S, e para um espaçador intergênico não transcrito (IGS). A outra classe de genes de RNAr codifica para RNAr 5S e consiste de uma sequências altamente conservada de 120pb separada de cada unidade transcricional por espaçadores não transcritos (NTS). Enquanto as sequências de genes RNAr são conservadas entre táxons não relacionados, os NTS apresentam uma grande variação quanto ao tamanho e composição da sequência, promovendo um dinamismo para os genes ribossomais (Martins *et al.* 2004; Martins 2006).

Durante muito tempo esses DNA repetitivos foram considerados DNA "lixo", por não terem função conhecida. Entretanto, acredita-se atualmente que sequências repetitivas tenham uma função estrutural, e que sejam de grande importância para a evolução do genoma de diversos organismos (Bie'mont e Vieira 2006). Essa hipótese é suportada pelo fato de que vários tipos de cópias de DNA repetitivo estão intimamente associados com regiões heterocromáticas, indicando que esse DNA não se distribui de maneira aleatória no genoma e que tal associação pode estar relacionada com a manutenção destas cópias no genoma (Mazzuchelli e Martins 2009). Além disso, sequências repetitivas estão envolvidas na evolução cromossômica por causarem quebras cromossômicas, deleções, inversões e até mesmo amplificações de determinados segmentos (Lim e Simmons 1992; Dimitri et al. 1997).

# 1.3.1 Elementos transponíveis

A classificação dos elementos transponíveis baseia-se nas características estruturais e moleculares de suas sequências, podendo ser agrupados em classes em que o modo de transposição é o critério utilizado para o agrupamento. Os elementos da classe I (retrotransposons) utilizam a transcriptase reversa para se transporem via um intermediário de RNA, sempre originando uma nova cópia (mecanismo replicativo) e os elementos da classe II (transposons) se transpõem diretamente de DNA a DNA usando a enzima transposase por eles codificada (Finnegan 1985). Ainda, o mecanismo de replicação via DNA pode ser conservativo ou replicativo. No primeiro, o elemento transponível é removido de um local e inserido em outro, enquanto que no segundo o transposon é duplicado antes de ser transportado para outro sítio (Burt e Trivers 2006).

Os retrotransposons podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de longas repetições terminais (LTRs, do inglês *long terminal repeats*). As LTRs são necessárias para a transcrição e integração do cDNA depois da transcrição reversa, sendo encontrados nestas sequências, domínios para proteinase, integrase, transcriptase reversa e RNAse. Já, os retrotransposons não-LTRs utilizam promotores internos para a sua transposição e codificam uma transcriptase reversa e uma RNAse, sendo também conhecidos como LINES (*long interspersed elements*) ou retrotransposons TP (*target-primed*). Além disso, dentro da categoria dos não-LTRs, existem também os SINES (*short interspersed nucleotide elements*), que não codificam a maquinaria enzimática necessária para a transposição, mas obtém esta provavelmente por meio dos elementos LINES (Bohne *et al.* 2008). Os transposons também podem ser subdivididos em duas

subclasses. Na subclasse I estão agrupados os elementos que possuem a tríade conservada DDE (D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico) na transposase, que é responsável pela excisão do elemento do seu sítio original e sua integração em um novo sítio, mecanismo conhecido como "corta e cola". Os da subclasse II não apresentam a transposase DDE, sendo sequências alternativas utilizadas para este fim (Bohne *et al.* 2008).

Devido a suas características (mobilidade, capacidade de autoduplicação, sequências terminais flanqueadoras conhecidas) os elementos transponíveis podem ser utilizados para identificar genes de relevância comercial em métodos tradicionais de seleção genética e utilizá-los como vetores para vacinação de DNA nos peixes, podendo diminuir a dosagem ou aumentar a duração da imunização (Lorenzen et al. 1998; Traxler et al. 1999; Coll 2001; Fernandez-Alonso et al. 2001; Purcell et al. 2004; Takano et al. 2004; Lorenzen e LaPatra 2005; Tafalla et al. 2006). Recentemente, vários elementos transponíveis heterólogos (Tc3, mariner, Tol2, Sleeping Beauty, Frog Prince, Rex, e Ac/Ds) foram aplicados com sucesso no peixe Danio rerio. Os elementos Tc3, de Caenorrhabditis elegans, e o mariner (Mos1), de Drosophila mauritiana, foram os primeiros transposons usados para gerar peixes transgênicos. Porém, dois elementos transponíveis originários de peixes, sendo eles o Tol2, um membro da superfamília hAT (hobo/Ac/Tam3) de Oryzias latipes e Sleeping Beauty (um membro sintético da superfamília Tc1/mariner) têm sido utilizados nos últimos anos (Parinov e Emelyanov 2007).

Desta forma, a utilização de elementos transponíveis no mapeamento físico cromossômico pode proporcionar uma melhor visão do genoma das espécies, de como este genoma está organizado e como ocorreu a sua evolução. Assim sendo, o

entendimento de como estas sequências se comportam frente a estresses ambientais é indispensável para aplicação em estudos de genética aplicada. Ao se analisar as características do tambaqui e o fato de se tratar de uma espécie endêmica das bacias do Amazonas e Orinoco, é possível compreender porque o tambaqui é o peixe mais importante na piscicultura da região amazônica. Além disso, por ser uma espécie nativa o risco de impacto ecológico negativo é minimizado caso esses indivíduos sejam introduzidos na natureza (SUFRAMA 2003).

# 1.4 Objetivos

# 1.4.1 Objetivo geral

Identificar e mapear sequências de DNA repetitivo em *Colossoma macropomum*, visando compreender como estes elementos se distribuem, como são transmitidos para seus descendentes e como respondem a estresse ambiental nesta espécie de peixe, considerada a mais representativa na piscicultura brasileira.

# 1.4.2 Objetivos específicos

- Mapear sequências repetitivas em tandem em Colossoma macropomum e comparar sua localização com as demais espécies da família Serrasalmidae.
- Localizar os elementos transponíveis da família Rex em Colossoma macropomum,
   Piaractus mesopotamicus e nos híbridos entre as duas espécies.
- Verificar possíveis correlações entre alterações na localização física cromossômica dos elementos repetitivos da família Rex (Rex1, Rex3 e Rex6) e variações de temperatura.

#### 2. Material e Métodos

# 2.1 Material e delineamento experimental

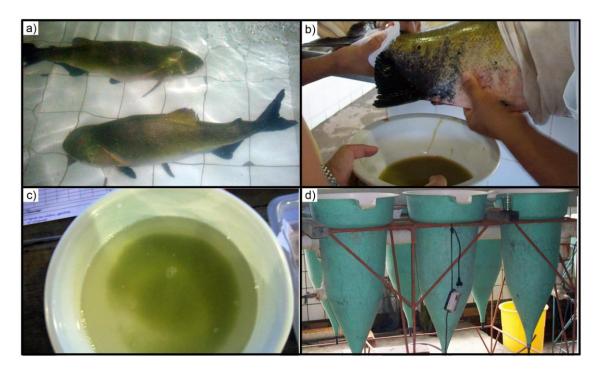
Para a obtenção dos exemplares de *C. macropomum* induziu-se a reprodução de dez indivíduos, sendo 5 machos e 5 fêmeas, provenientes da Fazenda Santo Antônio (Rio Preto da Eva – AM). Após a reprodução induzida dos cinco casais, os mesmos foram anestesiados para coleta das amostras de sangue, sendo este material utilizado para extração de DNA e para obtenção de preparações cromossômicas por meio da cultura de linfócitos.

A seleção dos reprodutores foi feita nos tanques da fazenda, analizando quais animais, entre machos e fêmeas apresentavam amadurecimento gonadal. Após isso, os animais foram separados em tanques (Figura 1a) e pesados para que fosse realizado o cálculo das doses de hormônios usados no soro hipofisário, que foi injetado sob a nadadeira peitoral dos indivíduos. Nas fêmeas foram utilizadas duas doses de hormônio (até 5,0 mg de hipófise por Kg), com intervalo de 12h entre elas, enquanto nos machos aplicou-se uma dose única após a aplicação da segunda dose hormonal nas fêmeas (Querol *et al.* 2013).

No momento da extrusão, os animais foram retirados dos tanques, anestesiados com eugenol e imobilizados com uma toalha. Realizou-se a coleta dos óvulos e do sêmen em uma bandeja plástica (Figura 1b), para que fossem imediatamente misturados. Após isso, o material foi hidratado por cerca de 1 minuto (Figura 1c) e colocados em incubadoras de fibra de vidro, na proporção de 200 g de ovos por incubadora (Figura 1d).

Passados 4 ou 5 cinco dias, as larvas foram acondicionadas em viveiros, e ao final de 90 dias, 20 tambaquis juvenis oriundos de cada um dos cruzamentos foram

transportados para o Laboratório de Genética Animal do INPA. Após isso os animais permaneceram em aquários por 40 dias, até serem anestesiados e sacrificados para a preparação de suspensões celulares, com intuito de verificar marcadores citológicos associados aos elementos transponíveis.



**Figura 1: a)** Reprodutores acondicionados em tanques; **b)** Ovócitos sendo extrusados em bandeja plástica; **c)** Processo de hidratação dos ovos; **d)** Incubadoras para eclosão e desenvolvimento das larvas.

Além disso, também foram analisadas amostras coletadas de outras espécies de Serrasalmídeos como *Mylossoma aureum*, *M. duriventri*, *Piaractus mesopotamicus* e o híbrido tambacu, resultante do cruzamento de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, sendo as espécies do gênero *Mylossoma* provenientes do Lago Catalão (AM / Brasil) e *P. mesopotamicus* e os híbridos vindos do Centro de Educação Tecnológica em Aquacultura (Monte Aprazível / SP).

Os peixes analisados foram numerados, registrados, fixados em formol 10% durante 24h e posteriormente acondicionados em recipientes contendo álcool 70%.

Exemplares de *Colossoma macropomum*, *Mylossoma aureum* e *M. duriventre* foram depositados na coleção ictiológica do INPA. Todas as coletas foram realizadas com autorização (ICMBio SISBIO 10609-1/2007).

### 2.2 Métodos

# 2.2.1 Indução de mitoses

Para se obter um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica para indução de mitoses, descrita por Oliveira *et al.* (1988), na qual uma solução de fermento biológico é aplicada nos espécimes. A solução de fermento biológico foi preparada com 0,3 g de fermento biológico comercial, 0,3 g de açúcar e 10 mL de água destilada, sendo esta solução mantida em estufa (46 °C) por um período de 15-20 minutos, e posteriormente injetada na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1mL para cada 100 g de peso do animal. Os peixes submetidos ao tratamento com solução de fermento biológico foram colocados em aquários bem aerados por 24 horas.

### 2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

As preparações metafásicas foram obtidas seguindo-se a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978), com algumas modificações, que consiste em injetar intraperitonealmente colchicina 0,0125% na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso do animal. Deixar o peixe em aquário bem aerado por 40 minutos. Em seguida anestesiar, sacrificar o peixe e retirar a porção anterior do rim transferindo-a para uma solução hipotônica de KCL 0,075 M (10 mL). Divulsionar bem o tecido com o auxílio de uma seringa de vidro. Retirar o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrífuga. Incubar a suspensão

celular obtida em estufa a 37 °C por 30 minutos. Pré-fixar com 6 gotas de metanol:ácido acético (3:1) e ressuspender o material com cuidado. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Desprezar o sobrenadante e completar para 6 mL com fixador, pipetando para ressuspender o material. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 6 mL de fixador, repetindo essa lavagem por mais duas vezes. Após a última centrifugação e a eliminação do sobrenadante, 1,5 mL de fixador foram adicionados e o material ressuspendido com cuidado. Essa suspensão celular foi então estocada em tubo eppendorf e mantida em freezer para posterior utilização. Para a preparação das lâminas as mesmas foram lavadas, secas ao ar e posteriormente imersas em água destilada a 50 °C, em banho-maria. Após cinco minutos, as lâminas foram retiradas da água de forma a manter uma película de água sobre a sua superfície, na qual foi gotejada a suspensão celular em diferentes regiões. As lâminas secaram diretamente ao ar.

#### 2.2.3 Cultura de linfócitos

Quando os indivíduos não puderam ser sacrificados, a obtenção das preparações cromossômicas mitóticas foi efetuada utilizando a técnica de cultura de linfócitos de sangue periférico descrita por Fenocchio e Bertollo (1988) com algumas modificações, que consistem em coletar 5ml de sangue periférico com seringas descartáveis heparinizadas. Transferir 0,3-0,4 mL de sangue total para 10 mL de meio de cultura completo para cariótipo (Cultilab) e levar para estufa BOD a 30 °C por 72 horas. Uma hora e meia antes do término deste período, acrescentou-se 0,1 mL de colchicina a 0,0125% ao meio de cultura, aguardando o final do período de incubação. Após este tempo, a cultura foi transferida para um tubo de centrífuga,

sendo o material centrifugado por cinco minutos, a 800 rpm. Após isso desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCI 0,075M) previamente aquecida a 37 °C. O material foi homogeneizado com uma pipeta Pasteur e colocado em estufa BOD a 37 °C por 30 minutos. Transcorrido o tempo total de hipotonização, o processo foi interrompido acrescentando-se 0,3 mL de fixador Carnoy (Metanol 3:1 Ácido Acético), recém-preparado. Centrifugou-se o material por dez minutos, a 900 rpm. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se à solução 10 mL de fixador Carnoy. Novamente o material foi ressuspendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 8mL de fixador Carnoy foram adicionados e a suspensão foi novamente centrifugada durante dez minutos a 950 rpm, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e a eliminação do sobrenadante, 1,5 mL de fixador foram adicionados e o material ressuspendido com cuidado. Essa suspensão celular foi então estocada em tubo eppendorf e mantida em freezer para posterior utilização.

# 2.2.4 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON) foi utilizada a técnica de precipitação de cristais de Prata (Ag-RON), descrita por Howell e Black (1980), com pequenas modificações. A técnica consistiu em pingar sobre a lâmina com a preparação cromossômica uma gota de uma solução coloidal, obtida com 1g de gelatina comercial sem sabor dissolvida em 50 mL de água destilada e acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico. Em seguida, adicionou-se sobre a solução coloidal duas gotas de solução aquosa de AgNO<sub>3</sub> (Nitrato de Prata) a 50%. A lâmina foi levemente agitada e coberta com lamínula. A lâmina foi mantida sobre chapa aquecedora a 60 °C por cerca de 5 minutos. Em seguida foi lavada em água

destilada de forma a permitir que a lamínula fosse retirada com o próprio jato de água. As lâminas secaram diretamente ao ar. Para facilitar a visualização das metáfases algumas lâminas foram posteriormente coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 2 minutos, lavadas em água corrente e secas ao ar.

# 2.2.5 Detecção da Heterocomatina Constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de banda C descrita por Sumner (1972), com adaptações. As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram tratadas durante 2 minutos com HCl 0,2N a 46 °C, lavadas em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada, a 46 °C, por 2 minutos e 30 segundos. Interrompeu-se a ação do hidróxido de bário imergindo-se a lâmina em solução de HCl 0,2N (46 °C) por cerca de 30 segundos, sendo posteriormente lavada em água destilada. Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (Cloreto de Sódio 0,3M e Citrato Trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por um período de 15 minutos, lavadas e secas ao ar. Posteriormente foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 20 minutos, lavadas em água corrente e secas novamente ao ar.

## 2.2.6 Extração de DNA

Para extração do DNA utilizou-se o tecido muscular. O protocolo de extração de DNA foi o descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. O tampão de lise utilizado foi (Tris-HCl pH 8,0 em 10 mM, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, SDS 1%) de Estoup *et al.* (1993) e Asahida *et al.* (1996). Posteriormente foram acrescentados:

15 μL de proteinase K (10 mg/mL) e 6 μL de RNAse (10 mg/mL). As amostras foram incubadas para que o tecido fosse totalmente digerido. A seguir foram feitas lavagens sucessivas com fenol, fenol clorofórmio, álcool isoamílico e clorofórmio hidratado (500µL de cada um destes reagentes). Após a lise, o DNA foi separado das proteínas por precipitação salina juntamente com centrifugação a 14000 rpm. O sobrenadante foi então precipitado com 600 µL de isopropanol 100%, também com o auxílio de centrifugação. Ao final, o DNA foi hidratado com aproximadamente 100 µL de água milli-Q, dependendo do tamanho do pellet (DNA precipitado) formado. Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por comparação com marcador de concentração conhecida, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com GelRed Acid Gel Stain Biotium (1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador Easy Doc 100 (BioAgency), o qual possui acoplado um transluminador de luz ultravioleta (260 nM). Adicionalmente, quantificações em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) foram realizadas.

# 2.2.7 Isolamento de sequências repetitivas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Elementos transponíveis já identificados e caracterizados como conservados em outras espécies de peixes, tais como os retroelementos da família Rex foram estudados. *Primers* foram testados para amplificar os elementos transponíveis Rex1 (RTX1-F1 5'TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC e RTX1-R3 5'TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC), Rex3 (RTX3-F3 5'CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG e RTX3-R3 5'TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volff *et al.* 1999; 2000; 2001a),

Rex6 (Rex6-Medf1 5'TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC e Rex6-Medf2 5'AGG AAC ATG TGT GCA GAA TATG) em combinação com os primers Rex6-Medr1 5'GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG ou Rex6-Medr2 5'GGT GGT TTC TCC TCC AAG CTCG (Volff et al. 2001b). Estes primers já foram utilizados para isolamento destes elementos repetitivos em diversos grupos de peixes, indicando serem boas ferramentas para o isolamento destas sequências. A amplificação destes elementos dos indivíduos amostrados foi realizada a partir do DNA celular total previamente isolado, sendo a amplificação realizada através da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction - Saiki et al. 1988). Os produtos da PCR fita dupla foram obtidos em um volume total de 25 µL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidade de Tag DNA Polimerase; 0,2 mM de cada dNTP - dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (primer); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume). As reações foram processadas em termociclador (Ependorff - Mastercycler Gradient). Depois de amplificado, os produtos da PCR foram verificados e quantificados por comparação com o marcador Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com GelRed Acid Gel Stain (Biotium 1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador Easy Doc 100 (BioAgency), o qual possui acoplado um transluminador de luz ultravioleta (260 nM). Adicionalmente, quantificações em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) foram realizadas. Após isolados os elementos foram utilizados como sondas para hibridização dos cromossomos metafásicos.

# 2.2.8 Hibridização *in situ* por fluorescência – FISH

Foi realizada a técnica de hidridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações, como a utilização de sondas simultâneas. A marcação da sonda 1 foi feita pelo método de *Nick translation*, com utilização do Kit BioNick<sup>TM</sup> Labeling System (Invitrogen), onde para uma lâmina foram pipetados em tubo de 1,5 ml no gelo 1  $\mu$ l de DNA (200  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de dNTP mix, 1  $\mu$ l de enzima mix e  $6\mu$ l H<sub>2</sub>O milli-Q . Esse material foi misturado, centrifugado brevemente e incubado por 45 minutos a 16 °C (no termociclador). A reação foi parada com a adição de 1  $\mu$ l de Stop Buffer. Feito isso, o material foi centrifugado e armazenado em freezer -20 °C.

A marcação da sonda 2 também seguiu o método de *Nick translation*, entretanto usou-se o Kit DIG-Nick<sup>TM</sup> Translation Mix (Roche). Para uma lâmina foram pipetados os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: 1,5 μl de DNA (200 μg/μl), 2 μl de mix do Kit, e 6,5 μl H<sub>2</sub>O milli-Q. Os reagentes foram misturados, centrifugados brevemente e incubados por 90 minutos a 16 °C em termociclador. Para cessar a reação adicionou-se 1 μl de EDTA 0,5M e colocou-se o material no termociclador por 10 minutos a 65 °C. Em seguida o material foi centrifugado rapidamente e colocado em freezer -20 °C até usar.

As lâminas foram tratadas com 100μl de RNase 40 μg/mL (0,4 μL de RNase 10 mg/mL e 99,6 μL de 2XSSC) por 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. Em seguida foram lavadas duas vezes em 2xSSC durante 10 minutos cada, e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% (etanol mantido no freezer) durante 10 minutos cada. As lâminas foram mergulhadas em formamida 70% em

2xSSC por 5 minutos a 70 °C, e novamente desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos cada. Após isso, as lâminas secaram ao ar.

Para a preparação da solução de hibridização adicionou-se em um tubo eppendorf 20 μl de formamida 100% (50% do volume final), 8 μl de sulfato de dextrano 50%, 4 μl da sonda A, 4 μl da sonda B, 4 μl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC), obtendo um volume final de 40 μl. A sonda foi desnaturada a 99 °C por 10 minutos e passada imediatamente ao gelo.

A etapa de hibridização foi realizada colocando-se 40 μl de solução de hibridização sobre a lamínula e invertendo a lâmina sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37 °C durante uma noite (aproximadamente 16 horas). Em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes em formamida 15%, 0,2xSSC pH 7,0 a 42 °C durante 10 minutos cada, 3 vezes em 0,1xSSC a 60 °C, por 5 minutos cada, e em solução Tween 0,5%, temperatura ambiente durante 5 minutos.

Após isso foi feita a detecção do sinal, que consistiu em incubar as lâminas em tampão NFDM (*Nonfat dry milk*) (5% NFDM/4xSSC) por 15 minutos e lavá-las 2 vezes com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos. Em tubo *eppendorf* foi feito um mix contendo 20 uL de anti digoxigenina-rodamina (1:200), 4 μL de FITC Avidina (1:100) e 26 μL de Tampão C para cada lâmina. A lâmina foi invertida sobre a lamínula e incubada por 60 minutos em câmara úmida a 37 °C. Passado esse período a lâmina foi lavada 3 vezes com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos.

A amplificação foi feita aplicando-se 20 μl de anti-avidina (1 μl de anti-avidina estoque em 19 μl de NFDM), sobre uma lamínula e invertendo a lâmina sobre a

lamínula. Em seguida, a lâmina foi incubada por 15 minutos em câmara úmida a 37 °C e lavada 3 vezes com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos. Após essa etapa o sinal foi detectado por meio de um mix contendo 20 uL de anti digoxigeninarodamina (1:200), 4 uL de FITC Avidina (1:100) e 26 uL de Tampão C para cada lâmina. Inverteu-se a lâmina sobre a lamínula e incubou-se a lâmina 15 minutos em câmara úmida a 37 °C. Na sequência a lâmina foi lavada 3 vezes com Tween 5% temperatura ambiente por 5 minutos, desidratada em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada, e seca ao ar.

Após todo esse processo, a lâmina foi montada com 20 μL de antifade + 1 μL de DAPI e coberta com lamínula. Os cromossomos metafásicos foram analisados e fotografados em um microscópio de fluorescência Olympus BX51. As imagens foram capturadas através do *software* Image-PRO MC 6.0, as melhores metáfases tiveram seus cromossomos emparelhados.

### 4. Conclusões Gerais

A evolução cariotípica do clado basal de Serrasalmidae baseia-se em rearranjos cromossômicos que permitem a manutenção do número diploide 2n=54 para todos os gêneros do clado dos pacus. Entretanto, quando se comparam os dados do presente trabalho com os descritos para todos os serrasalmídeos com cariótipo descrito, observa-se que a família possui uma tendência para o aumento do número diploide nas espécies derivadas, assim como para o aumento no número de sítios de DNAr 18S.

A distribuição dos retroelementos Rex1, Rex3 e Rex6 no genoma dos exemplares analisados evidencia que esses elementos não possuem tendência a acumúlos em regiões específicas dos cromossomos, estando dispersos em porções hetero e eucromáticas. Entretanto, em condições de estresse devido a mudanças ambientais ou processos de hibridização, esses elementos transponíveis têm a capacidade de aumentar sua dispersão no cariótipo de *C. macropomum* e no híbrido tambaqui, passando a ter, inclusive uma localização preferencial em blocos heterocromáticos, como observado para o Rex6.

## 5. Referências Bibliográficas

- Aguiar, J.; Schneider, H.; Gomes, F.; Carneiro, J.; Santos, S.; Rodrigues, L.R.; Sampaio, I. 2013. Genetic variations in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepances in farming systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4): 1439-1447.
- Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção deste ciclo? Série Monografias SBG. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 43p.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A.; Bernardino, G.; Ferrari, V.A., Alcantara, R.C.F. 1987. Cytogentic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: Tiews, K. (Ed.) *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture* v 1. Bordeox, France, p189-195.
- Almeida-Val, V. M. F.; Schawntes, M.L.B.; Val, A. L. 1991. LDH isozymes in Amazon fishes. II. Temperature and pH effects on LDH kinetics properties from *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98: 79-86.
- Alzohairy, A.M.; Yousef, M.A.; Edris, S.; Kerti, B.; Gyulai, G. Bahieldin, A. 2012. Detection of LTR retrotransposons reactivation induced by *in vitro* environmental stresses in Barley (*Hordeum vulgare*) via RT-qPCR. *Life Science Journal* 9(4): 5019-5026.

- Araujo-Lima, C.A.R.M.; Goulding, M. 1998. Os frutos do Tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia, Sociedade Civil Mamirauá/CNPq/Rainforest Alliance, Brasil. 186p.
- Arkhipova, I.R.; Rodriguez, F. 2013. Genetic and epigenetic changes involving (retro) transposons in animal hybrids and polyploids. *Cytogenetic and Genome Research*, 140: 295-311.
- Asahida, T.; Konayashi, T.; Saitih, K.; Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sicence*, 62(5): 727-730.
- Barthem, R.B.; Fabré, N.N. 2004. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. *In:* Rufino, M.L. *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira*. IBAMA/Pró-Várzea, Manaus, Amazonas. p. 17-62.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 7:103-120.
- Bieé-mont, C.; Vieira, C. 2006. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443:521–524. (DOI:10.1038/443521a).
- Blauth, M.L.; Bruno, R.V.; Abdlhay, E.; Loreto, E.L.S.; Valente, L.S. 2009. Detection of P element transcripts in embryos of *Drosophila melanogaster* e *D. willistoni*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(4): 679-689.
- Boeke, J.D. 1989. Transposable elements in *Saccharomyces cerevisae*. Mobile DNA. *Am. Soc. Microbiol. Washington*, 335-374.

- Bohne, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schultheis, C.; Volff, J. N. 2008.

  Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.
- Brinn, M.N.A., Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2004. Karyological evidence for interespecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. *Hereditas*, 141: 252-257.
- Brookfield, J. 2005. The ecology of the genome-mobile DNA elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 5:128–136.
- Brown J.D.; Golden, D.; O'Neill, R.J. 2008. Methylation perturbations in retroelements within the genome of a *Mus* interspecific hybrid correlate with double minute chromosome formation. *Genomics*, 91: 267–273.
- Brown J.D.; Piccuillo V.; O'Neill, R.J. 2012. Retroelement demethylation associated with abnormal placentation in *Mus musculus* × *Mus caroli* hybrids. *Biol Reprod*, 86: 88.
- Burt, A.; Trivers, R. 2006. *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements.*Cambridge: Harvard University Press, p. 228-300.
- Cabral Jr, W.; Almeida, O.T. 2004. Avaliação do mercado e indústria pesqueira na Amazônia. *In:* Almeida; O.T. *A indústria pesqueira na Amazônia.* IBAMA/Pró-Várzea, Manaus, Amazonas. p. 17-39.
- Calcagnotto, D.; Schaefer, S.A.; DeSalle, R. 2005. Relationships among Characiformes fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36:135-153.
- Capy, P. 1998. *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. 1<sup>st</sup>. France: Landes Bioscience, 197p.

- Capy, P.; Gasperi, G.; Biémont, C.; Bazin, C. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution for useful parasites? *Heredity*, 85: 101-106.
- Centofante, L, Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2002. Chromosomal polymorphism in Serrasalmus Spilopleura Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from central Amazon basin. Caryologia, 55:37-45.
- Cestari, M.M.; Galetti Jr., P.M. 1992a. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay River: evolutionary and cytotaxonomic considerations. *Copeia*, 1:108-112.
- Cestari, M.M.; Galetti Jr, P.M. 1992b. Chromosome evolution in the genus Serrasalmus and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). Brazilian Journal of Genetics, 15(3):555-567.
- Chakrani, F.; Capy, P.; David, J.R. 1993. Development temperature and somatic excision rate of marine transposable elemento in three natural populations of *Drosophila simulans. Genetics Selection Evolution*, 25: 121-132.
- Charlesworth, B.; Langley, C. H. 1986. The evolution of self-regulated transposition of transposable elements. *Genetics*, 112: 359-383.
- Chew, J.S.K., Oliveira, C., Wright, J.M., Dobson, M.J., 2002. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, 111: 45–52.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo. L.A.C. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribossomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 271.

- Coll, J.M. 2001. El transposon SB de salmonidos como vector para transferência de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias*, 16: 237–244.
- Dairiki, J.K.; Silva, T.B.A. 2011. Revisão de Literartura: Exigências nutricionais do tambaqui-compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM.
- Davidson, A.E.; Balciunas, D.; Mohn, D.; Shaffer, J.; Hermanson, S.; Sivasubbu, S.;
  Cliff, M.P.; Hackett, P.B.; Ekker, C. 2003. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. *Developmental Biology*, 263: 191–202.
- Deininger, P. L.; Moran, J. V., Batzer M. A, Kazazian-J.R. H. H. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics* & *Development*, 13:651–658.
- Dimitri, P.; Arca, B.; Berghella, L.; Mei, E. 1997. High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila* melanogaster. Proceedings Natural Academic Science, USA. (DOI: 10.1073/pnas.94.15.8052).
- Dunham, R.A.; Majumdar, K.; Hallerman, E.; Bartley, D.; Mair, G.; Hulata, G. Liu, Z.
  Pongthana, N.; Bakos, J.; Penman, D.; Gupta, M.; Rothlisberg, P.; Schark, G.
  2001. Review of the status of aquaculture genetics. *In:* Subasinghe, R.P.; Bueno,
  P.; Phillips, M.J.; Hough, C.; McGladdery, S.E.; Arthur, J.R. *Aquacultire in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand. p. 137-166.
- Estoup, A.; Presa, P.; Krieg, F.; Vaiman, D.; Guyomard, R. 1993. (CT)n and (GT)n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71: 488-496.

- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (eds): *Fish adaptation.* Ibh and Oxford, New Dehli and New York. p. 285-308.
- Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C. 1988. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética*, 11:847-852.
- Fernandez-Alonso, M.; Rocha, A.; Coll, J.M. 2001. DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19: 3067–3075.
- Ferreira, D.C.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2011. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements* 1 (2): 112 117.
- Finnegam, D.J. 1985. Transposable elements in eukaryotes. *International Review of. Cytology*, 93:281-326.
- Franck, J.P.C.; Wright, J.M.; McAndrew, B.J. 1992. Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapia (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 35: 719-725.
- Franck, J.P.C. Wright, J.M. 1993. Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36: 187-194.
- Franck, J.P.C.; Kornfield, I.; Wright, J.M. 1994. The utility of SATA satellite DNA sequences for inferring phylogenetic relationships among the three major genera of tilapiine cichlid fishes. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 3: 10-16.
- Freeman, B.; Nico, L.G.; Osentoski, M.; Jelks, H.L.; Collins, Y.M. 2007. Molecular systematics of Serrasalmidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, 1484:1–38.

- Fujino, K.; Hashida, S.N.; Ogawa, T.; Natsume, T.; Uchiyama, T.; Mikami, T.; Kishima, Y. 2011. Temperature controls nuclear importo f Tam3 transposase in *Antirrhinum. The Journal Plant*, 65: 146-155.
- Galetti Jr, P.M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. *In* Guerra. M. (Ed) *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Editora da Sociedade Brasileira de Genética, p. 61-88.
- Garcia, C.; Moreira–Filho, O. 2005. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology*, 3:285-290.
- Garcia-Parra, W.J. 2000. Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalmidae, Characiformes) da Amazônia Central. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.
- Gaviria, J.I.; Nirchio, M.; Granado, A.; Estrada, A. 2005. Karyotype and nucleolar organizer regions of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. *Interciencia*, 30(1):44-47.
- Gomes, L.C.; Silva, C.R. 2009. Impact of Pound management on tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier), production during growth-out phase. Aquaculture Research, 40: 825-832.
- Goulding, M. 1980. The fishes and the forest exploration in Amazonian natural history. University of California press, Berkeley.

- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010.

  Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76:1117-1127.
- Hägele, K.; Oschmann, B. 1987. Non-reciprocal gonadal dysgenesis in hybrids of the chironomid midge *Chironomus thummi*. III. Germ line specific abnormalities. *Chromosoma*, 96: 50–54.
- Hashida, S.N.; Kitamura, K.; Mikami, T.; Kishima, Y. 2003. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in *Antirrhinum majus. Plant Physiology* 32: 1207-1216.
- Hashida, S.N.; Uchiyama, T.; Martin, C.; Kishima, Y.; Sano, Y.; Mikami, T. 2006. The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *The Plant Cell* 18: 104-118.
- Hoffman, A.A.; Parsons, P.A. 1991. *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press, Oxford.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 3:1014-1015.
- IBAMA, 2003. Estatística da Pesca Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação, Tamandaré, Pernambuco. 96pp.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A., Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*. 19: 4780.
- Ivashuta, S.; Nawnkina, M.; Gau, M.; Uchiyama, K.; Isobe, S.; Mizukami, Y.; Shimamoto, Y. 2002. Genotype dependente transcriptional activation of novel

- repetitive elements during cold acclimation of alfafa (*Medicago sativa*). The plant journal, 31 (5): 615-627.
- Jégu, M. 2003. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). *In:* Reis, R.E; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, p. 182-196.
- Junk, W.J. 1985. The Amazon floodpain a sink or source organic carbon. *Mitt. Geol. Paleont*, 58: 267-283.
- Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Kohany, O.; Jurka, M.V. 2007. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annual Review Genomics Human Genetics*. 8:241–259.
- Kaminker, J.S.; Bergman, C.M.; Kronmiller, B.; Carlson, L.; Sviskas, R.; Patel, S. Frise, E.; Wheeler, D.A.; Lewis, S.E.; Rubin, G.M. *et al.* 2002. The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology*, 3:12.
- Kaplan, N.L.; Darden, T.; Langley, C. 1985. Evolution and extintion of transposable elements in Mendelian populations. *Genetics*, 109: 459-480.
- Kidwell, M.G.; Kidwell, J.F.; Sved, J.A. 1977. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*, 86: 813-833.
- Kubtiza, F. 2004. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *In: Panorama da Aquicultura*. Vol. 14 (82).
- Largaespada, D.A. 2003. Generating and manipulating transgenic animals using transposable elements. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 (80): 1-10.

- Laudencia-Chingcuanco, D.; Fower, D.B. 2012. Genotype dependente burts of transposable elemento expression in crowns of hexaploid wheat (*Triticum aestivum L.*) during cold acclimation. *Comparative and Funcional Genomics*. Doi: 10.1155/2012/2325230.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Lim, J.K.; Simmons, M.J. 1992. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster. Bioessays*, 16: 269-275. (DOI: 10.1002/bies.950160410).
- Lorenzen, N.; Lorenzen, E.; Eoner-Jensen, K.; Heppell, J.; Wu, T., Davis, H. 1998.

  Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 8: 261–270.
- Lorenzen, N.; LaPatra, S.E. 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. Rev. Sci. Technol. Office Int. Epizooties, 24: 201–213.
- Mansour, A. 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. *Journal of Cell and Molecular Biology* 6(2): 99-107.
- Martins, C.; Galetti Jr, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Research. 7:363-367.
- Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Wright, J.M. 2000. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas*, 133: 39-46.
- Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Parise-Maltempi, P.P.; Wright, J.M.; Foresti, F.2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis*

- niloticus) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. Cytogenetic and Genome Research, 98: 76–85.
- Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P.; Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent *in situ* hybridization of the repetitive DNAs to metaphase chromosomes a review. *Aquaculture*, 231: 37-39.
- Martins, C. 2006. Estudios citogenéticos en peces mediante hibridación fluorescente in situ. In: Nirchio, M.; Oliveira, C. Citogenética de Peces, Editora da Universidad de Oriente, Nueva Esparta, Venezuela. p.110-134.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds). Fish Cytogenetics. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. p. 421-453.
- Matsuo, A.Y.O.; Val, A.L. 2007. Dietary tissue cadmium accumulation in an amazonian teleost (Tambaqui, *Colossoma macrpomum* Cuvier, 1818). *Brazilian Journal of Biology*, 67: 657-661.
- Mazzuchelli, J.A.; Swarça, A.C.; Dias, A.L. 2007. Structural chromosome polymorphism in a *Pimelodus maculates* La Cepède, 1803 population (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paranapanema River Basin, PR, *Brazil. Braz. J. Biol.* 67(4):935-937.
- Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus. Genetica*, 136: 461-469. (DOI: 10.1007/s10709-008-9346-7).

- McClintock, B. 1984. The significance of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Melamed, P.; Gong, Z.; Fletcher G.; Hew, C.L. 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255-369.
- Mendonça, P.P.; Ferreira, R.A.; Vidal Junior, M.V.; Andrade, D.R.; Santos, M.V.B.
  2009. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui
  (Colossoma macropomum). Arch Zootec 58(223): 323-331.
- Ministério da Pesca e Aquicultura. 2011. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011.
- Muramoto, J.I.; Ohno, S.; Atkins, N.B. 1968. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. Chromosoma 24:59-66.
- Nakaghi, L.S.O. 1996. Estudos estruturais e ultraestruturais das gônadas do peixe híbrido tambacu. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2000. Ocorrência de dois citótipos em Serrasalmus spilopreura Kner, 1958 (Characiformes, Serrasalmidae) na região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica, 30(1):149-154.
- Nakayama, C.M.; Jégu, M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* group (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia* 3:866-869.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2002. A comparative cytogenetic study of five piranhas species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetica*, 114:231-236.

- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2008. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three piranha species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4): 868-873.
- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalmidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 53-58.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. 4 ed. John Wiley and Sons, New York. 624p.
- Nirchio, M.; Fenocchio, A.S.; Swarça, A.C.; Pérez, J.E.; Granado, A.; Estrada, A.; Ron, E. 2003. Cytogenetic characterization of hybrids offspring between Colossoma macropomum (CUVIER, 1818) and Piaractus brachypomus (CUVIER, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. Caryologia, 56(4):405-411.
- Okamoto, H.; Hirohiko, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. Trends in Plant Science. 6(11): 527-534.
- O'Neill, R. J.; Eldridge, M. D.; Graves, J. A. 2001. Chromosome heterozygosity and de novo chromosome rearrangements in mammalian interspecies hybrids. Mamm Genome 12: 256–259.
- Oliveira, C. 1988. Estudos citogenéticos no gênero "Corydoras" (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 154 pp.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.; Foresti, F.; Britski, H.; Toledo Filho, A. 1988.

  Choromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética*, 11: 577-624.

- Oliveira, C.; Wright, J.M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205-211.
- Oliveira, E.C.; Araújo-Lima, C.A.R. 1998. Distribuição das larvas de *Mylossoma* aureum e *M. duriventre* (Pisces, Serrasalmidae) nas margens do rio Solimões AM. *Revista Brasileira de Biologia*, 58 (3): 349-358.
- Oliveira, C.; Wang, Y.; Bryden, L.J.; Wright, J.M., 2003. Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis nilotipycus*, and their chromosomal localization by fluorescent *in situ* hybridization. *Caryologia*, 56:177–185.
- Ortí, G.; Petry, P.; Porto, J.I.R.; Jégu, M.; Meyer, A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42:169-182.
- Ortí, G.; Sivasundari, A.; Dietz, K.; Jégu, M. 2008. Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetic and Molecular Biology*, 31:343-351.
- Ozouf-Costaz, C.; Brant, J.; Körting, C.; Pisano, E.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.P.; Volff, J.N. 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotranposon REX1 and REX3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16(1): 51-57.
- Parinov, S.; Emelyanov, A. 2007. Transposable elements in fish functional genomics: technical challenges and perspectives. *Genome Biology*, (8): 51-56.
- Pérez, J.E. 1996. *Mejoramiento Genetico en Acuicultura*. Editora da Universidad de Oriente, Cunamá, Venezuela.

- Pérez, J. 2006. Los caracteres cromosómicos y la acuacultura. *In:* Nirchio, M.; Oliveira, C. *Citogenética de peces.* Editora da Universidad de Oriente, Nueva Esparta, Venezuela. p.100-109.
- Phillips, R.B.; Reed, K.M. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Porto, J.I.R. 1999. Análises cariotípicas e sequenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalmidae) da bacia amazônica. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas, Manaus.
- Porto-Foresti, F.; Hashimoto, D. F.; Alves, A. L.; Almeida, R. B. C.; Senhorini, J. A. Bortulozzi, J.; Foresti, F. 2008. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*. 31(1): 195-202.
- Purcell, M.K.; Kurath, G.; Garver, K.A.; Herwig, R.P.; Winton, J.R. 2004. Quantitative expression profiling of imune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunology*. 17: 447–462.
- Querol, M.V.M.; Pessano, E.F.C.; Brasil, L.G.; Chiva, E.Q.; Gralha, T.S. Eds. 2013.

  Tecnologia de reprodução de peixes em sistema de cultivo: Indução hormonal através do extrato hipofisário da Palometa. Distribuição digital, UNIPAMPA, 81p.

- Ribeiro, L. B.; Matoso, D. A.; Feldberg, E. Chromosome mapping of repetitive sequences in four serrasalmid species (Serrasalmidae, Characiformes). Aceito para publicação no periódico *Genetics and Molecular Biology*.
- Richards, C.L.; Bossdorf, O.; Pigliucci, M. 2010. What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution? BioScience, 60:232-237.
- Rocha, A., Ruiz, S., Estepa, A., Coll, J.M., 2004. Application of inducible and targeted genestrategies to produce transgenic fish: a review. *Marine Biotechnology*, 6: 118–127.
- Rouzic, A.L.; Capy, P. 2005. The First Steps of Transposable Elements Invasion:

  Parasitic Strategy vs. Genetic Drift. Genetics Society of America. DOI:

  10.1534/genetics.104.031211.
- Ruffino, M.L.; Silva, E.C.S.; Silva, C.O.; Barthem, R.B.; Silva, V.B.; Estupinan, G.; Pinto, W. 2006. Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará 2003. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/ProVárzea. 76 pp.
- Ruiz-Silva, J. 2012. Isolamento e caracterização de elementos transponíveis em espécies do gênero Brycon (Characidae, Bryconinae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, SP.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A.1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY.

- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.1999. Peixes da Bacia Amazônica. *In:* Lowe-McConnell, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. p.345-373.
- Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/ProVárzea. 237 p.
- Santos, M.C.F.; Ruffino, M.L.; Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71:33-44.
- Santos, M.C.F.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serradalmidae, Characiformes), as economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Permanent Genetic Resousces Note* (DOI10.1111/j.1755-0990.20808.02331.x).
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R., Martins, C.; Feldberg, E. 2012. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. Rev. Fish Biol. Fisher 23(2):201-214.
- Schütt, S.; Florl, A. R.; Shi, W.; Hemberger, M.; Orth, A. 2003. DNA methylation in placentas of interspecies mouse hybrids. Genetics 165: 223–228.
- Sherrat, D. 1989. Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition. *Mobile DNA*, 163-184.
- Silva, C.R.; Gomes, L.C.; Brandão, F.R. 2007. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. *Aquaculture*, (264): 135-139.

- Silvano, R.A.M.; Ramires, M.; Zuanon, J. 2009. Effects of fisheries management on fish communities in the floodplain lakes of a Brazilian Amazonian Reserve. *Ecology of Freshwater Fish,* (18): 156-166.
- Slotkin, R.K.; Martienssen, R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nature Reviews Genetics 8: 272-285.
- Suframa, 2003. Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica Piscicultura sumário executivo. p.18.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75:304-306.
- Tafalla, C.; Estepa, A.; Coll, J.M. 2006. Fish transposons and their potential use in aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 123: 397–412.
- Takano, T.; Iwahori, A.; Hirono, I.; Aoki, T. 2004. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 17: 367–374.
- Teixeira, W.G.; Ferreira. I.A.; Mello, D.C.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal. D.; Polleto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125: 224-234.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012. Stable karyotypes: a general rule for the fish of the family Prochilodontidae? *Hydrobiologia*, 686:147-156.

- Toledo-Filho, S.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Bernardino, G.; Calcagnoto, D. 1994. *Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui*. Cadernos de Ictiogenética 2: 25p.
- Torti, C.; Malacrida, A.; Yannopoulos, G.; Louis, C.; Gasperi, G. 1994. Hybrid dysgenesis like phenomena in the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). J Hered. 85: 92-99.
- Traxler, G.S.; Anderson, E.; LaPatra, S.E.; Richard, J.; Shewmaker, B.; Kurath, G. 1999. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquatic Organ.*, 38: 183–190.
- Ungerer, M.C.; Kawakami, T. 2013. Transcriptional dynamics of LTR retrotransposons in early generation and ancient sunflower hybrids. *Genome Biology and Evolution* 5(2): 329-337.
- Valente, G.T., Mazzuchelli, J., Ferreira, I.A., Poletto, A.B., Fantinatti, B.E.A., Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetics Genome Research*, 133: 34-42.
- Volff, J.N., Korting, C., Sweeney, K., Schartl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon Rex3from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology* and Evolution, 16: 1427–1438.
- Volff, J.N., Korting, C., Schartl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673–1684.

- Volff, J.N., Hornung, U., Schartl, M. 2001a. Fish retroposons related to the *Penelope* element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 711–720.
- Volff, J.N., Körting, C., Froschauer, A., Sweeney, K., Schartl, M. 2001b. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 52: 351–360.
- Volff, J.N., Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*, 9: 674-678.
- Volff, J.N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity 94: 280-294.
- Voltolin, T.A.; Laudicina, A.; Senhorini, J.A.; Bortolozzi, J.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. 2010. Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. Genetica 138:1133-1139.
- Wright, J.M. 1989. Nucleotide sequence, genomic organization and the evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*).

  Nucleid Acid Research, 17: 5071-5079.