**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**
**DIVISÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – DIGEN**

# Citotaxonomia de *Boulengerella* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Ctenoluciidae) da região amazônica central

José Francisco de Sousa e Souza

Manaus, AM – fevereiro de 2017

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**
**DIVISÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – DIGEN**

# Citotaxonomia de *Boulengerella* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Ctenoluciidae) da região amazônica central

José Francisco de Sousa e Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Orientadora:** Eliana Feldberg, Dra. – INPA

Coorientador: Luiz Antônio Carlos Bertollo- UFSCAR

Manaus, AM –fevereiro de 2017

**FICHA CATALOGRÁFICA**

S719 Souza, José Francisco de Sousa e

Citotaxonomia de Boulengerella Eigenmann 1903 (Characiformes: Ctenoluciidae) da região Amazônica Central /José Francisco de Sousa e Souza. --- Manaus: [s.n.], 2017.

xiii, 46 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2017.

Orientadora: Eliana Feldberg

Coorientador: Luiz Antônio Carlos Bertollo

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Ctenoluciidae. 2. Peixes amazônicos. I. Título.

CDD 597.48

Sinopse

Foram estudadas quatro espécies de *Boulengerella* (Ctenoluciidae, Characiformes), coletadas nos rios Negro e Uatumã (AM), com intuito de verificar o mecanismo de evolução cromossômica no gênero. As análises revelaram um conservadorismo na macroestrutura cromossômica (número e forma) e no padrão da região organizadora de nucléolo. Entretanto, a localização da heterocromatina C-positiva e dos genes de DNAr 5S, bem como a distribuição das sequências de DNAr 18S/teloméricas mostraram-se marcadores resolutivos. A presença de um heteromorfismo cromossômico relacionado ao par nucleolar, associado com um acúmulo incomum de sequências teloméricas, sugere um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, o qual será objeto de investigações futuras.

**Palavras–chave:** Peixes amazônicos, estudos citogenéticos, DNAr 18S, DNAr 5S, Fiber FISH, análises evolutivas.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PPG GCBEv GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA — INPA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA — MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES — BRASIL GOVERNO FEDERAL

**ATA DA DEFESA PÚBLICA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

No dia 03 de Março de 2017, às 14:30 horas, no Auditório do PPG BADPI, Campus II-INPA, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de MESTRADO**, composta pelos seguintes Doutores(as), membros titulares: Daniele Aparecida Matoso, Alessandro Gasparetto Bifi e Miriam Silva Rafael ; tendo como membros suplentes: Natália Dayane Moura Carvalho e Rafaela Priscila Ota, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** do estudante **JOSÉ FRANCISCO DE SOUSA E SOUZA**, intitulada: **"Citotaxonomia de *Boulengerella* (Characiformes: Ctenoluciidae) da região amazônica central".** O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Eliana Feldberg, do INPA e coorientação do Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo - UFSCAR.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

☐ Aprovado por maioria ☐ Reprovado
☒ Aprovado por unanimidade

**Menção**:
☐ Aprovado com "Distinção" ☐ Aprovado com "Distinção e Louvor"

Foi lavrada a ata e assinada pelos Doutores(as), membros presentes da Banca Julgadora.

Daniele Aparecida Matoso - UFAM _____

Alessandro Gasparetto Bifi -INPA Alessandro Gasparetto Bifi

Miriam Silva Rafael – INPA _____

Natália Dayane Moura Carvalho –UFAM _____

Rafaela Priscila Ota – INPA _____

*Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse*
*Coordenadora do PPG GCBEv*
*PO. 258/2014 – INPA/MCTI-PR*

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INPA GCBEv

**Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEv Art. 62 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEv. Para obtenção do titulo, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEv.**

Programas de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – PPG INPA
Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – PPG GCBEv
Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69080-971 - Manaus-AM – Caixa Postal: 2223 - Fone/Fax: (0xx92) 3643-3344
e-mail: gcbev@inpa.gov.br gcbeve@gmail.com http://gcbev.inpa.gov.br/

Dedico aos meus pais, em especial aos meus tios (Oliveira e Maria José) que me acolheram e me educaram e hoje eu pude chegar aqui.

A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.

Charles Darwin

***Veni, vidi, vici***

**A realização deste estudo foi possível devido:**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) e ao laboratório de Genética Animal (INPA). Aos financiamentos fornecidos pelo Programa Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade, Edital Nº 047/2012, CAPES, Área Temática Contemplada: Recursos (produtos) naturais – "Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos"; pelo projeto INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2 - Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA e pelo Pronex/FAPEAM/CNPq 003/2009- Processo: 653:2009 - Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais.

**Agradecimentos**

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pelo espaço e apoio ao desenvolvimento desta pesquisa. A CAPES pela conceção da bolsa e ao CNPq e Fapeam pela apoio e aprovação dos projetos aprovados ao laboratório de genética animal (LGA).

Meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora Eliana Feldberg, que foi como uma mãe durante todo o mestrado, muito obrigado por ter acreditado no meu potencial mesmo quando cheguei sem saber nada no seu laboratório, palavras não seriam suficientes para agradecer todo carinho e todos os ensinamentos e conselhos que recebi ao longo desses dois anos de mestrado, muito obrigado mesmo por ter se importado comigo e sempre perceber quando estava triste por alguma razão e você sempre tinha uma palavra de consolo e ajuda, sou muito grato de tê-la como orientadora.

Ao meu Co-orientador Luiz Antônio Carlos Bertollo, por acreditar e aceitar me co-orientar, obrigado pelo seu empenho em sempre me ajudar quando precisei, com dicas e correções quando se fez necessário, para mim foi uma honra ter o senhor como coorientador.

Em especial aos meus tios: (Oliveira e Maria José) palavras não seriam suficientes para demostrar todo amor e gratidão que tenho por vocês que foram e são minhas inspirações, que me educaram e deram todo afeto e amor e hoje podemos contemplar os frutos desse amor.

Aos meus pais (José Alberto e Maria do Socorro) que sempre me incentivaram a continuar e perseverar, que nos momentos mais difíceis tinham uma palavra de amor e conforto, muito obrigado pai e mãe amo muito vocês e tenho muito orgulho de te-los como pais.

Aos meus irmãos Alexandre Sousa, Sariane Sousa, Anna Catarina, Vanessa Souza, Larissa Oliveira, Robiane Oliveira, meus irmãos quanta falta sinto de vocês, o processo de amadurecimento como muitas pessoas falam é de fato árduo, como foi difícil ficar longe de vocês, longe dos meus sobrinhos(as), mas todo esse esforço valeu apena e hoje agradeço a vocês pelo apoio e pelo amor de irmão que sempre tivemos, meu muito obrigado especial a minha irmã Sariane Sousa pelo apoio todos esses anos, por estar sempre pronta a me ajudar quando eu precisei.

Ao meu Amigo, conselheiro e irmão adotivo Marck Torres, meu irmão mais velho, você tem sido mais que um amigo ou irmão, você foi um dos melhores presentes que Deus poderia me dar, palavras não seriam suficientes para lhe agradecer o que tens feito por mim, nem para expressar toda a admiração que sinto por você como pessoa e como excelente profissional que és, grande parte do que eu sou hoje devo graças a você, não tenho como pagar tudo que já tens feito por mim, sua generosidade é tanta que me apresentou uma pessoa que já mora no meu coração, sua mãe ou melhor nossa mãe, (Dona Raimunda), que pessoa maravilhosa e de bom coração é nossa mãe, cada dia que passa me encanto ainda mais com seus conselhos e conhecimentos, e a sua generosidade é tanta meu amigo, que ainda ganhei dois irmãos em Manaus (Marcia Torres e Marcio Torres), sua família me recebeu de braços abertos e com muito amor e aqui, na sua cidade, foram minha família adotiva durante todos esses anos de mestrado, e eu só tenho a agradecer todo o carinho e afeto que tiveram comigo todos esses anos.

Aos meus amigos Raíssa Moura, Sidney Seixas, Rafaella Damasceno, Amanda Batista, Lívia Souza, Edilaine Lemes, Allison Maranho, Mario Pinheiro, Marcos Wyllian, muito obrigado pelo carinho e amor de vocês, vocês foram partes essenciais para que eu pudesse concluir esse trabalho muito obrigado, e meu muito obrigado especial aos dois manauaras que foram um presente para mim (Fábio Gomes e Yasmin Farias) espero que essa amizade se fortaleça cada dia mais, muito obrigado pelo companheirismo, pelas risadas, e pelos momentos incríveis que compartilhamos juntos ao longo desses dois anos vocês foram e são muito importantes para mim.

Aos meus colegas de laboratório Patrick Viana, Milena Ferreira, Carlos Faresin, Ramon Favarato, Lucas Caetano, Leila Ribeiro, Leandro Marajó, Arlindo Batista meu muito obrigado pela ajuda e paciência na hora de me ajudar na parte de bancada, obrigado pela amizade e momentos bons que passamos juntos ao logo desse mestrado.

As minhas amigas de Pós-graduação que quero levar para vida toda: Samara Souza e Valeria Santos, vocês são mais que especiais para mim, amo muito cada uma de vocês, espero que possamos amadurecer ainda mais essa amizade, vocês são parte fundamental dessa conquista.

**Resumo**

A família Ctenoluciidae tem sido considerada o provável grupo-irmão das famílias Erythrinidae, Lebiasinidae e Hepsetidae. O gênero *Boulengerella* possui cinco espécies conhecidas como bicudas. No presente estudo quatro espécies: *Boulengerella cuvieri, B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*, coletadas nos rios Negro e Uatumã (Amazonas, Brazil) foram analisadas citogeneticamente por procedimentos convencionais e moleculares. As quatro espécies possuem 2n=36 cromossomos (14m+16sm+6st e NF=72). O padrão heterocromático foi espécie-específico, com bandas C-positivas nas regiões centroméricas e bitelomérica de vários cromossomos, além de alguns blocos intersticiais. A região organizadora do nucléolo (RON) foi localizada na constrição secundaria terminal, nos braços longos do par 18, nas quatro espécies, sendo confirmado pelo mapeamento do DNAr 18S. O DNAr 5S foi localizado em dois pares cromossômicos: na região terminal do braço longo do par 1 nas quatro espécies e na região centromérica do par 10 em *B. lateristriga*, *B. maculata* e *B. Cuvieri* e do par 4 em *B. lucius*. A sonda telomérica destacou regiões terminais em todos os cromossomos, com um grande acúmulo no par 18, coincidente com a RON, bem como uma sequência intersticial (ITS) na região centromérica do par 3 de *B. lateristriga*, *B. maculata* e *B. cuvieri*. Nenhuma região positiva para 5S HindIII foi evidenciada. É notável um particular heteromorfismo cromossômico do par 18, nos exemplares machos das quatro espécies, onde um dos homólogos é bem maior que o outro, sugerindo um possível sistema de cromossomos sexuais XX/XY.

**Palavras chave:** Peixes amazônicos, estudos citogenéticos, marcadores cromossômicos clássicos e moleculares, análises evolutivas.

**Abstract**

Ctenoluciidae has been allocated to the superfamily Erythrinoidea, which also includes the Erythrinidae, Lebiasinidae and Hepsetidae families. Molecular and cytogenetic data are still scarce for most groups in this superfamily, with Erythrinidae being is the best-studied family until now. Inside Ctenoluciidae, the genus *Boulengerella* comprises five species, which are known as pike-characins. In the present study, four species, *B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius and B. maculata*, from the Negro and Uatumã rivers, in Amazonas State, Brazil, were analyzed using conventional and molecular cytogenetic procedures. All four species have 2n = 36 chromosomes (14m+16sm+6st and NF=72). The heterochromatic pattern display mainly centromeric and bitelomeric C-positive bands, with some of them being species-specific. The nucleolus organizer region (NOR) is located in the secondary terminal constriction in the long arms of pair 18, in all four species, as confirmed by the mapping of the 18S rRNA. The 5S rRNA sites are located on two chromosome pairs: in the terminal region of the long arms of pair 1 in all four species, and in the centromeric region of pair 10 in *B. lateristriga*, *B. maculata* and *B. cuvieri* and pair 4 in *B. lucius*. FISH using telomeric probes highlighted the terminal regions of all chromosomes, with a major accumulation in pair 18 in accordance with the NOR location, in addition to interstitial sequences (ITS) in the centromeric region of pair 3 in *B. lateristriga*, *B. maculata* and *B. cuvieri*. No evidence of positive 5S *Hind*III regions was found in any species. Remarkably, a conspicuous male chromosomal heteromorphism occurs in heterozygous form in pair 18 of the four species, which may be related to a particular XX/XY sex chromosome system in this fish group.

**Key words:** Amazonian fish, chromosomal data, conventional and molecular markers, evolutionary analyses.

**Sumário**

1. Introdução ..... 1

1.1. Ordem Characiformes ..... 1

1.2. Família Ctenoluciidae ..... 2

1.2.1. Descrição e distribuição das espécies de *Boulengerella* ..... 3

1.2.2. Relações Filogenéticas de Ctenoluciidae com outros Characiformes ..... 6

1.3. Citogenética de Erythrinoidea ..... 8

1.4. A importância da citogenética em estudos citotaxonômicos ..... 10

2. Objetivos ..... 10

2.1. Objetivo geral ..... 10

2.2. Objetivos específicos ..... 10

3. Material e Métodos ..... 12

3.1. Material ..... 12

3.2. Métodos ..... 12

3.2.1. Indução de mitoses ..... 12

3.2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos ..... 12

Técnicas citogenéticas clássicas ..... 13

3.2.3. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONs ..... 13

3.2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva ..... 14

3.2.5. Coloração por fluorocromos base-específicos DAPI (AT-específico) e Cromomicina $A_3$ (GC–específico) ..... 14

3.2.6. *Fiber*-FISH ..... 14

3.2.7. Extração de DNA total ..... 15

3.2.8. Isolamento de sequências repetitivas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 15

3.2.9. Marcação das sondas ..... 17

3.2.11. Tratamento das lâminas ..... 17

3.2.12. Pré-hibridização ..... 17

3.2.13. Solução de hibridização ..... 17

3.2.14. Hibridização ..... 18

3.2.15. Lavagens das lâminas ..... 18

3.2.16. Detecção do sinal de hibridização ..... 18

3.2.17. Montagem das lâminas ..... 18

3.2.18. Análises cariotípicas ..... 18

4. Resultados e Discussão ..... 20

6. Conclusões ..... 35

7. Referências Bibliográficas ..... 37

**Lista de Figuras**

**Figura 1**: *Boulengerella cuvieri*, 19 cm. Fonte: Vari, 1995.

**Figura 2**: *Boulengerella lateristriga*, 11,6 cm. Fonte: Vari, 1995.

**Figura 3**: *Boulengerella lucius*, 26,6 cm. Fonte: Vari, 1995.

**Figura 4**: *Boulengerella maculata*, 16,8 cm. Fonte: Vari, 1995.

**Figura 5**: *Boulengerella xyrekes*, 21,5 cm.Fonte: Vari, 1995.

**Figura 6**: Cladograma da Hipótese filogenética mais parsimoniosa, com base em caracteres morfológicos, proposta por Vari (1995) para as famílias: Lebiasinidae, Hepsetidae, Erythrinidae e Ctenoluciidae.

**Figura 7**: (a) Hipótese morfológica sugerida por Buckup (1998), onde Acestrorhynchidae é colocada como grupo irmão da superfamília Erythrinoidea; (b) Hipótese molecular, com base em dados mitocondriais e nucleares, sugerida por Calcagnotto *et al.* (2005), onde Alestidae e Crenuchidae são sugeridas como grupo irmão de Erythrinoidea.

**Figura 8**: Parte da árvore filogenética, sugerida por Oliveira *et al.* (2011), com base em dados moleculares, mostrando as relações entre Ctenoluciidae, Lebiasinidae, *Chalceus*, *Bryconops*, Iguanodectinae, Acestrorhynchidae, Roestinae, *Heterocharax*, *Hoplocharax* e *Gnatocharax*. Onde Ctenoluciidae e Lebiasinidae formam um clado, considerado grupo irmão de Characoidea.

**Figura 9**: Mapa com os pontos de coleta das quatro espécies de *Boulengerella.* (1) UHE de Balbina, rio Uatumã; (2) Anavilhanas, rio Negro; (3) Novo Airão, rio Negro; (4) Catalão, baixo rio Negro.

**Figura 10**: Cariótipo das espécies analisadas em coloração convencional com Giemsa, bandeamento C e Ag-RON: (a, b, c) *B. lateristriga*; (d, e, f) *B. cuvieri*; (g, h, i) *B. maculata*; (j, k, l) *B. lucius*. Em destaque o par 18, evidenciando o heteromorfismo da constrição secundária e RON nos espécimes machos.

**Figura 11**: Cariótipos das espécies analisadas com marcadores cromossômicos moleculares. “double” FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (a, c, e g). FISH com sonda (TTAAGG)n (verde) (b, d, f, h). *B. lateristriga* (a-b); *B. cuvieri* (c-d); *B. maculata*(e-f); *B. lucius*(g-h).

**Figura 12**: *Fiber*-FISH nas espécies analisadas utilizando sonda de DNAr 18S (vermelho) e (TTAGGG)n em (verde), a) *Boulengerella lateristriga*, b) *B. cuvieri*, c) *B. maculata;* d) *B. lucius*.

**Figura 13**: Coloração por fluorocromos base-específicos: DAPI (AT-específico), em azul e Cromomicina A3 (GC–específico), em verde. Metáfase de fêmea e macho de *B. lateristriga* em coloração por fluorocromo Cromomicina $A_3$ (GC específico), evidenciando sítios positivos correspondentes à localização da região organizadora de nucléolo (RON).

**Tabela**

Tabela 1. Espécies analisadas, número de indivíduos e local de coleta.

# 1. Introdução

## 1.1. Ordem Characiformes

Ostariophysi é considerada a segunda maior superordem de peixes teleósteos, composta por cinco ordens: Gymnotiformes, Siluriformes, Characiformes, Cypriniformes e Gonorynchiformes, que tem se tornado foco de estudos anatômicos, evolutivos e genéticos devido sua ampla diversidade ecológica e morfológica (Nelson 2006).

Os Characiformes se destacam dentre os Ostariophysi, por sua história evolutiva e seu valor comercial (Lundberg 1993; Reis *et al*. 2003; Nelson 2006). Atualmente, essa ordem é composta por 24 famílias (Nelson *et al.* 2016), sendo que quatro ocorrem na África (Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae), que somam cerca de 200 espécies. As demais famílias ocorrem no sudoeste dos Estados Unidos, México e Américas Central e do Sul [Acestrorhynchidae, Anostomidae, Bryconidae, Curimatidae, Chalceidae, Characidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Ctenoluciidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Iguanodectidae, Lebiasinidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Serrasalmidae, Triportheidae e Salminopsidae [(extinto)] (Oliveira *et al.* 2011; Albert *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2016).

Os representantes desta ordem apresentam variação na forma corporal, na estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (Vari e Malabarba 1998), são caracterizados pelo corpo coberto de escamas cicloides, presença de nadadeira adiposa, anal e pélvica, linha lateral curvada e, às vezes, incompleta e dentes bem desenvolvidos, com espécies de grande porte (*Hydrocynus goliath*), que pode ultrapassar 1m de comprimento até espécies miniaturas como, *Microcharacidium weitzmani*, que mede 1,2 cm. São conhecidos, popularmente, como lambaris, piabas, charutinhos, curimatãs, traíras, bicudas entre outros; habitam diferentes ambientes aquáticos desde águas lênticas a correntezas e disparidade no hábito alimentar desde detritívoros, herbívoros, planctívoros, até predadores topo de cadeia (Ortí e Meyer 1997; Buckup 1998).

A história evolutiva dos Characiformes é datada de antes da separação total dos continentes americano e africano (Nelson 2006), e representa um dos casos mais extremos de adaptação e radiação evolutiva entre os grupos atuais de vertebrados (Weitzman 1962), estimando-se que sua divergência deve ter ocorrido aproximadamente a 106 e 84 milhões de anos atrás, no Cretáceo (Lundberg 1993). A posição filogenética de grande parte dos

representantes da ordem Characiformes ainda é provisória, devido à falta de hipóteses consistentes de relações de parentesco entre os membros da ordem, que em geral são formuladas com base em estruturas morfológicas (Uj 1990; Lucena 1993; Vari 1995; Buckup 1998; Malabarba 1998; Malabarba e Weitzman 2003) e, algumas vezes, características moleculares (Ortí e Meyer 1997; Calcagnotto *et al*. 2005).

A superfamília monofilética Erythrinoidea, por exemplo, tem passado por diversas reformulações e, atualmente, não possui uma filogenia definida. A princípio, foi proposto que essa superfamília fosse formada por: Ctenoluciidae, Erythrinidae, Lebiasinidae e Hepsetidae (Lucena 1993; Vari 1995; Buckup 1998; Oyakawa 1998) e, apesar do avanço nos estudos sobre Characiformes, algumas dessas famílias continuam com pouco ou nenhum dado que sejam congruentes para formulação de uma hipótese filogenética robusta. Ctenoluciidae que até então era considerada membro dessa superfamília por diversos autores (Vari 1995; Buckup 1998; Lucena e Menezes 1998; Oyakawa 1998; Calcagnotto *et al.* 2005; Netto-Ferreira 2006; 2010), atualmente, foi sugerida como grupo irmão da superfamília Characoidea (Oliveira *et al.* 2011; Nelson *et al.* 2016). Essa divergência entre os autores se dá, em grande parte, devido à falta de subsídios capazes de sustentar suas hipóteses. Com base nisso, com intuito de fornecer subsídios citotaxonômicos, para um melhor entendimento dos ctenoluciídeos, essa família foi o foco do presente estudo.

### 1.2. Família Ctenoluciidae

Ctenoluciidae é constituída por dois gêneros: *Ctenolucius* Gill, 1861, com duas espécies e *Boulengerella* Eigenmann, 1903, com cinco espécies (Vari 1995; 2003; Nelson *et al.* 2016). Possuem corpo alongado, cilindriforme e ligeiramente comprimido, com mandíbulas também alongadas com pequenos e numerosos dentes cônicos voltados para trás e focinho alongado e rígido. O lábio superior possui uma extensão carnosa altamente vascularizada, que permite ao animal sobreviver, caso fique confinado em uma poça. A nadadeira dorsal está localizada na metade posterior do corpo, na porção anterior ou sobreposta em linha vertical à origem ou término da nadadeira anal (Santos *et al*. 1984; Vari 1995; 2003; Queiroz *et al.* 2014). As nadadeiras pélvica e anal apresentam uma margem preta e a nadadeira caudal uma faixa preta nos raios medianos. Possuem escamas ctenoides estriadas e ásperas ao tato. A coloração varia de acordo com a espécie, sendo o dorso normalmente cinza, com os flancos e o ventre prateados com inúmeras manchas escuras (Santos *et al*. 1984; Vari 2003).

*Ctenolucius* não ocorre no Brasil, sendo descrito para os rios do Panamá e da Colômbia, que deságuam no oceano Pacífico e da Venezuela. No entanto, *Boulengerella* ocorre nos rios das Guianas, nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Tocantins. Atualmente, *Boulengerella* abriga cinco espécies: *Boulengerella maculata, B. lateristriga, B. lucius, B.cuvieri* e *B. xyrekes*, sendo que todas ocorrem na Amazônia e são popularmente conhecidas por "bicudas" (Vari 1995; 2003). São peixes predadores, com algumas espécies podendo chegar a medir até 1m de comprimento.

Alimentam-se basicamente de pequenos peixes e insetos, são extremamente vorazes e grandes saltadores. Um dos aspectos marcantes dessas espécies é a capacidade de saltar fora d'água quando se alimentam, atacando suas presas com saltos sucessivos e acrobáticos, impulsionados somente pela nadadeira caudal. Podem habitar águas lênticas, correntezas e águas rasas, sendo preferencialmente encontrados em águas claras ou negras, devido ao seu hábito de predador visual (Queiroz *et al.* 2014). Possuem grande importância na pesca artesanal (Santos *et al.* 1984; 2004) e comercial de subsistência e no mercado aquarista ornamental (Santos *et al*. 1984; Castro 1986; Vari 1995; 2003) que, segundo Howells e Rao (2003) tem feito com que as espécies *Ctenolucius hujeta*, *Boulengerella maculata* e *B. lucius* fossem introduzidas em parques dos EstadosUnidos.

### 1.2.1. Descrição e distribuição das espécies de *Boulengerella*

*Boulengerella cuvieri* (Agassiz, 1829)

*Boulengerella cuvieri* (Figura 1) é a maior espécie do gênero, com os adultos chegando a medir cerca de 1m de comprimento. Possui a maior distribuição geográfica entre as espécies do gênero e, por isto, possuem uma grande variação morfológica quanto à coloração, que varia de acordo com a região onde se encontra. É caracterizada por apresentar uma mácula escura na base do pedúnculo caudal, nadadeira dorsal anterior à linha transversal que passa pela origem da nadadeira anal, possui uma faixa escura ligeiramente lateral e algumas manchas na superfície do corpo. Ocorre nas bacias do Essequibo, Orinoco e Amazonas, Tocantins, Oiapoque, rios costeiros dos Estados do Amapá e Pará, bacia do médio e baixo rio Madeira, nos lagos do Cuniã, Puruzinho e Sampaio, rio Machado e rio Manicoré (Vari 1995; Buckup *et al.* 2007; Queiroz *et al.* 2014).

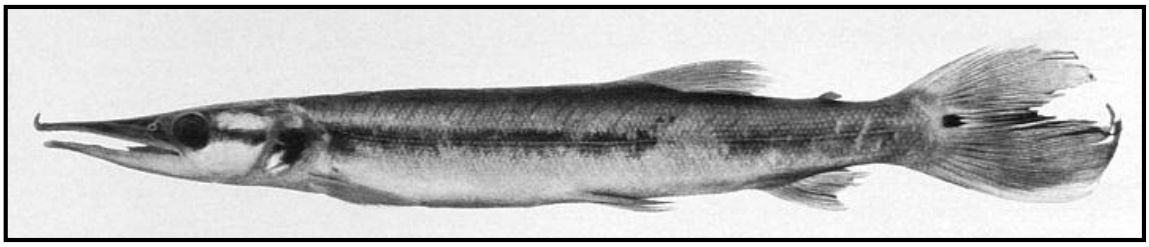

**Figura 1**. *Boulengerella cuvieri*, 19,0 cm. Fonte: Vari 1995.

*Boulengerella lateristriga* (Boulenger, 1895)

*Boulengerella lateristriga* (Figura 2) é a menor espécie do gênero, com os adultos chegando a medir 24 cm, distingue-se das demais espécies do gênero por possuir uma faixa horizontal que se estende desde a porção posterior da órbita até o pedúnculo caudal, possui nadadeira dorsal anterior à linha transversal que passa pela origem da nadadeira anal e faixas transversais sobre os lóbulos da nadadeira caudal. Ocorre nos rios Negro, Amazonas e na porção sul do Orinoco (Vari 1995; Buckup *et al*. 2007).

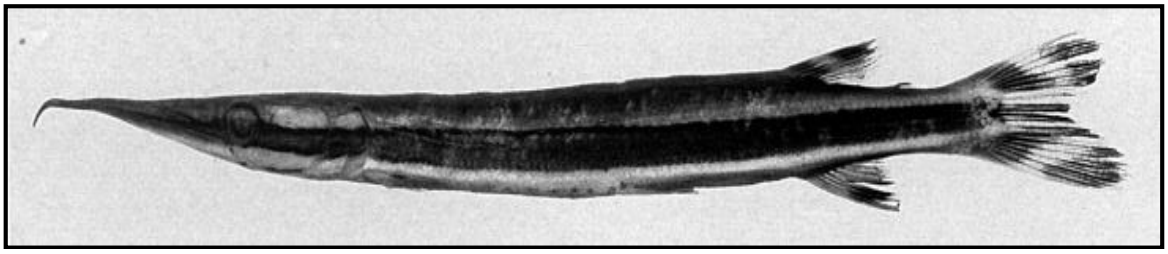

**Figura 2**. *Boulengerella lateristriga*, 11,6 cm. Fonte: Vari 1995.

*Boulengerella lucius* (Cuvier, 1816)

*Boulengerella lucius* (Figura 3) é a segunda maior espécie do gênero, medindo cerca de 42 cm, sendo algumas vezes identificada erroneamente como *B. maculata*. Esta espécie difere de *B. maculata*, principalmente, por possuir o último raio da nadadeira dorsal, em linha transversal na porção anterior da nadadeira anal, possui algumas máculas escuras pelo corpo, coloração prateada e faixas transversais sobre a nadadeira caudal. Ocorre nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco (Vari 1995; Buckup *et al*. 2007).

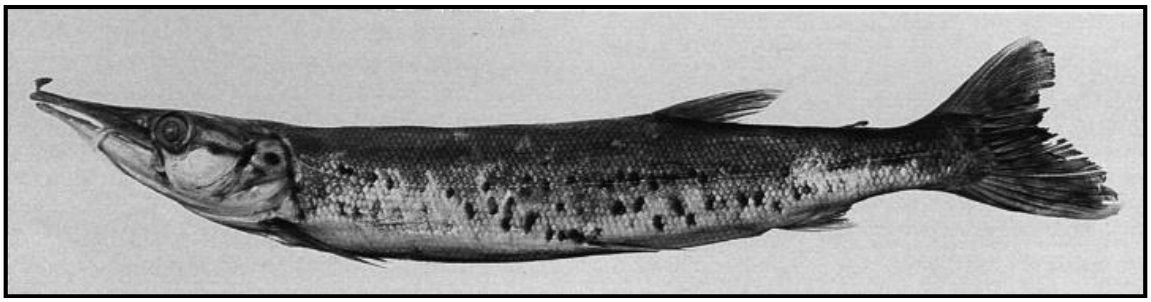

**Figura 3**. *Boulengerella lucius*, 26,6 cm.Fonte: Vari 1995.

*Boulengerella maculata* (Valenciennes, 1849)

*Boulengerella maculata* (Figura 4) é uma espécie de porte médio, chegando a medir 32 cm, alimenta-se exclusivamente de peixes, possui uma estreita faixa escura localizada na porção parietal antes do opérculo, a linha lateral é interrompida na porção anterior do corpo, distingue-se das demais espécies do gênero por possuir diversas máculas escuras sobre o corpo. Esta espécie difere de *B. lucius* por possuir nadadeira dorsal em linha transversal que passa pela origem da nadadeira anal. Ainda, pode variar quanto à pigmentação na cabeça, corpo, número de vértebras e escamas da linha lateral, dependendo da região onde se encontra. Entretanto, estas variações não são suficientes para distinguir as populações ou justificar seu reconhecimento como espécies distintas. É encontrada nos rios Negro, Amazonas, Madeira, Tapajós, Tocantins e bacia do Orinoco (Vari 1995; Buckup *et al*. 2007; Queiroz *et al.* 2014).

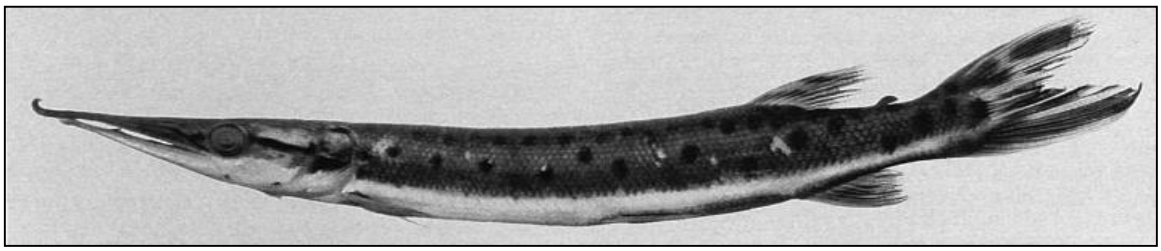

**Figura 4**. *Boulengerella maculata*, 16,8 cm. Fonte: Vari 1995.

*Boulengerella xyrekes* Vari, 1995

*Boulengerella xyrekes* (Figura 5) é a mais nova espécie descrita para Ctenoluciidae, com os adultos chegando a medir cerca de 39 cm, é muito semelhante a *B. cuvieri*, o que causa confusão na identificação dessas duas espécies. Possui nadadeira dorsal em linha transversal distintamente anterior à nadadeira anal, característica que a distingue de seus congêneres, exceto de *B.lucius* e *B. cuvieri*. *Boulengerella xyrekes* difere de *B. cuvieri* no número de vértebras e no número de escamas da linha lateral. Ocorre nos rios Negro, Amazonas e Orinoco (Vari 1995; Buckup *et al*. 2007).

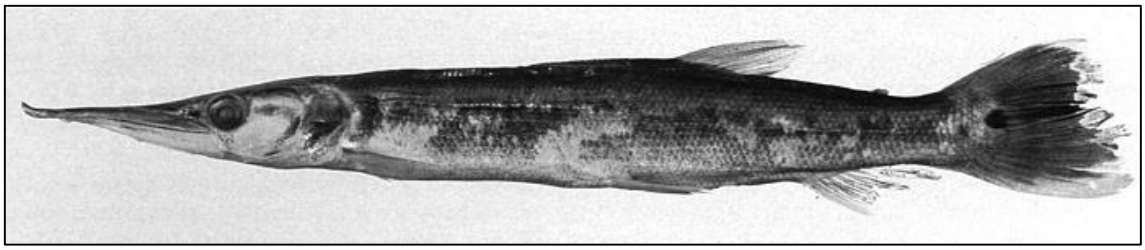

**Figura 5**. *Boulengerella xyrekes*, 21,5 cm. Fonte: Vari 1995.

### 1.2.2. Relações Filogenéticas de Ctenoluciidae com outros Characiformes

Segundo Vari (1995), Ctenoluciidae, juntamente com Erythrinidae, Lebiasinidae e Hepsetidae são considerados membros de um grupo natural com 22 sinapomorfias, que suportam a hipótese de monofiletismo da superfamília, onde Lebiasinidae, de acordo com as características listadas por (Weitzman 1964), seria basal nessa hipótese filogenética (Figura 6).

Essa hipótese foi posteriormente corroborada por Buckup (1998), que ainda sugere a família Acestrorhynchidae como grupo irmão de Erythrinoidea. Entretanto, esta hipótese de Buckup foi refutada por Lucena e Menezes (1998), que consideraram Acestrorhynchidae como grupo-irmão de Cynodontidae (Figura 7a).

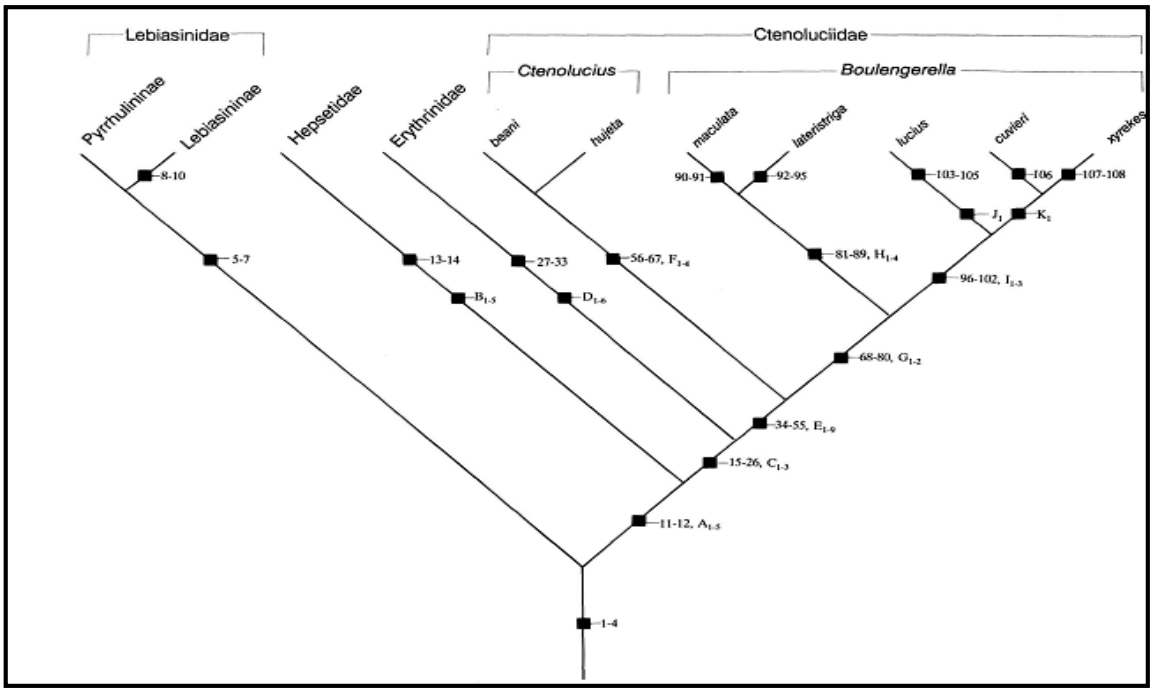


**Figura 6**. Cladograma da Hipótese filogenética mais parsimoniosa, com base em caracteres morfológicos, proposta por Vari (1995) para as famílias: Lebiasinidae, Hepsetidae, Erythrinidae e Ctenoluciidae.

Posteriormente, Calcagnotto *et al.* (2005), com base em dados mitocondriais e nucleares, propuseram a inclusão de um clado para Erythrinidae e Crenuchidae, como grupo irmão de Alestidae, Ctenoluciidae, Lebiasinidae e Hepsetidae (Figura7b).

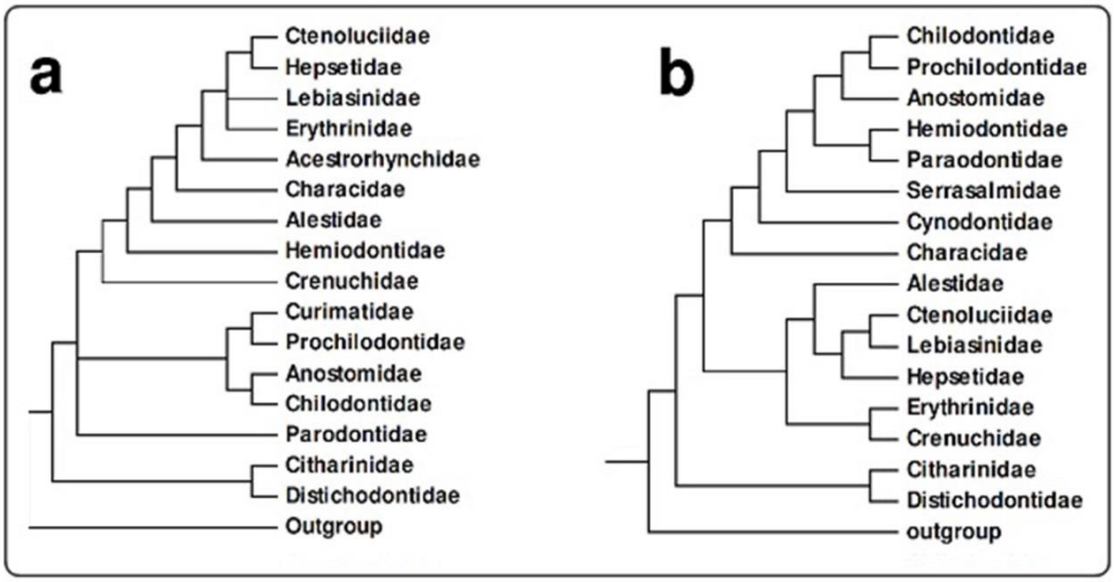


**Figura 7**. (a) Hipótese morfológica sugerida por Buckup (1998), onde Acestrorhynchidae é colocada como grupo irmão da superfamília Erythrinoidea; (b) Hipótese molecular, com base em dados mitocondriais e nucleares, sugerida por Calcagnotto *et al.* (2005), onde Alestidae e Crenuchidae são sugeridas como grupo irmão de Erythrinoidea.

Oliveira *et al.* (2011) propuseram, a partir de dados moleculares, uma nova formulação para superfamília Erythrinoidea e sugeriram que Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Prochilodontidae e Serrasalmidae são membros da superfamília Erythrinoidea e que Ctenoluciidae juntamente com Lebiasinidae constituem um grupo, que é considerado grupo irmão da superfamília Characoidea (Figura 8).

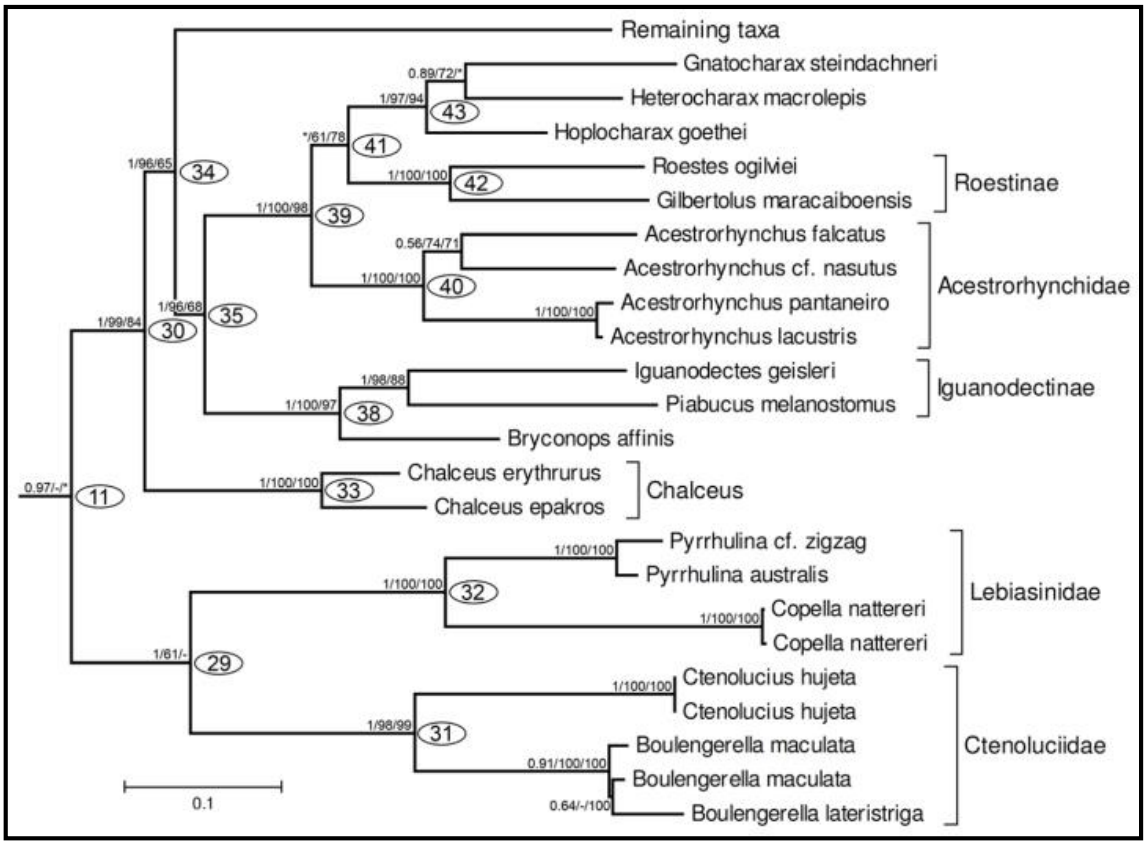


**Figura 8.** Parte da árvore filogenética, sugerida por Oliveira *et al.* (2011), com base em dados moleculares, mostrando as relações entre Ctenoluciidae, Lebiasinidae, *Chalceus*, *Bryconops*, Iguanodectinae, Acestrorhynchidae, Roestinae, *Heterocharax*, *Hoplocharax* e *Gnatocharax*. Onde Ctenoluciidae e Lebiasinidae formam um clado, considerado grupo irmão de Characoidea.

Embora haja uma quantidade razoável de estudos acerca das relações filogenéticas de Ctenoluciidae (Vari 1995; Buckup 1998; Lucena e Menezes 1998; Oyakawa 1998; Calcagnotto *et al.* 2005, Netto-Ferreira 2006; 2010; Oliveira *et al.* 2011), ainda não há um consenso sobre a exata posição da mesma, bem como das demais famílias que compõem a superfamília Erythrinoidea.

### 1.3. Citogenética de Erythrinoidea

A superfamília Erythrinoidea já possui alguns de seus representantes analisados citogeneticamente e dentre eles, a família Erythrinidae é a mais estudada. É formada por *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1896 e *Hoplias* Gill, 1903, todos endêmicos da América do Sul. Possuem grande diversidade cariotípica (Bertollo *et al.* 1983; 2000; Cioffi *et al.* 2013).

*Hoplias* é o gênero que apresenta a mais ampla distribuição geográfica e tem sete cariomorfos (A-G) descritos, sendo que o número diploide varia de 2n=39/40 a 42 cromossomos. Ainda, três sistemas de cromossomos sexuais foram descritos: XX/XY no

cariomorfo B, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ no cariomorfo D e $XX/XY_1Y_2$ no cariomorfo G e XX/XY em estágio preliminar de diferenciação no cariomorfo C (Bertollo 2007; Cioffi *et al*. 2012). Essa variação de sistemas cromossômicos sexuais é decorrente de amplificações de sequências de DNA repetitivo, sendo formados a partir de rearranjos cromossômicos estruturais (Bertollo *et al*. 1983; 1997; 2000; Cioffi e Bertollo 2010a).

Em relação às regiões organizadoras do nucléolo (RON) foram evidenciadas até 10 marcações ativas em algumas populações de *Hoplias malabaricus*; RON bitelomérica e polimorfismos, quando se utilizou sondas DNAr 18S. Variação no número e posição de sítios de DNAr 5S também foi evidenciada, revelada por FISH (Bertollo *et al*. 1997; Born e Bertollo 2000; Vicari *et al.* 2003; 2005; da Rosa *et al*. 2009; Cioffi *et al*. 2009a; b).

Para *Hoplias lacerdae* (trairões) foi identificado 2n=50 cromossomos, com uma estrutura cariotípica conservada e sem ocorrência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, nas populações já estudadas (Morelli *et al.* 2007; Blanco *et al*. 2011; de Oliveira *et al*. 2015).

Em *Hoplerythrinus* o número diploide varia de 2n=48 a 52 cromossomos com números variáveis de cromossomos acrocêntricos, indicando um possível complexo de espécies e sem presença de cromossomos sexuais heteromórficos (Diniz e Bertollo 2003; Rosa *et al.* 2012).

Atualmente, para o gênero *Erythrinus*, apenas *Erythrinus erythrinus* possui estudos citogenéticos, com quatro cariomorfos descritos. O cariomorfo A apresenta 2n=54 e não possui sistema de cromossomos sexuais, o cariomorfo B possui 2n=54/53 cromossomos e sistema sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, os cariomorfos C e D apresentam 2n=52/51 cromossomos, com sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, contudo, diferem entre si na estrutura cromossômica, sendo que para esta espécie foram detectados cromossomos B (Bertollo *et al*. 2004).

Para a família Lebiasinidae existem poucos estudos citogenéticos, porém o número diploide varia de 24 cromossomos (Scheel 1973) a 44 (Arefjev 1990), com uma grande quantidade de cromossomos acrocêntricos.

Até o presente momento, a família Hepsetidae não possui dados citogenéticos e Ctenoluciidae tem apenas duas citações de número diploide: Porto *et al.* (1992), que identificaram 2n=36 cromossomos para *Boulengerella* sp. e Arefjev (1990) que encontrou 2n=36 para *Ctenolucius hujeta*, o que justifica uma análise citogenética nesta família.

### 1.4. A importância da citogenética em estudos citotaxonômicos

A citogenética de peixes é datada da década de 60, tendo um grande impulso com os trabalhos de Mc-Phail e Jones (1966). Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais iniciaram com os trabalhos de Andreata (1971), em *Synbranchus marmoratus*, sendo consolidados no Brasil a partir dos trabalhos de Cestari (1973), Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1981; 1993), que adaptaram protocolos para obtenção de cromossomos mitóticos de peixes.

As técnicas de bandeamento cromossômico e o aprimoramento das técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) fizeram com que a citogenética desse um grande salto qualitativo no estudo dos cromossomos. A utilização de sondas de DNAr 5S e 18S tem sido empregada na diferenciação de espécies e na compreensão da organização do genoma de peixes (Bertollo *et al.* 1986; Galetti e Martins 2004).

Em Erythrinidae, por exemplo, Oyakawa e Mattox (2009) identificaram, com base em dados morfométricos e merísticos, quatro espécies dentro do grupo *lacerdae*: *H. intermedius*, *H. brasiliensis*, *H. australis* e *H. curupira*, que apresentam 2n=50 cromossomos e mesma fórmula cariotípica, no entanto diferenças significativas foram observadas quanto à distribuição de DNAs repetitivos (Blanco *et al.* 2011). Por outro lado, *Hoplias malabaricus* é tida como um complexo de espécies, uma vez que dados morfológicos não separam os cariomorfos (A-G), detectados pela análise citogenética, utilizando o mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos de DNA (Bertollo 2007).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar citogeneticamente espécies do gênero *Boulengerella* que ocorrem na Amazônia Central e comparar com dados disponíveis para outras famílias que compõem a superfamília Erythrinoidea.

### 2.2. Objetivos específicos

a) Detectar as relações cariotípicas entre as espécies do gênero, considerando a distribuição de marcadores cromossômicos clássicos e moleculares (número diploide, fórmula cariotípica, distribuição da heterocromatina C-positiva, Ag-RON, DNAr 5S, DNAr 18S, 5S HindIII e DNA telomérico).

b) Detectar as principais diferenciações cromossômicas que ocorreram na carioevolução das espécies analisadas.

c) Verificar a existência de possíveis variações intra-específicas indicativas de ocorrência de espécies crípticas entre as populações estudadas.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Material

Indivíduos de quatro espécies do gênero *Boulengerella* foram analisados: *B. lateristriga* (7 machos, 7 fêmeas) coletados em Novo Airão; *B. cuvieri* (6 machos, 8 fêmeas) coletados no Rio Negro, próximo ao lago Catalão; *B. maculata* (7 machos, 8 fêmeas) coletados no Rio Negro, próximo ao lago Catalão e em Anavilhanas; *B. lucius* (5 fêmeas) coletadas à jusante da hidrelétrica de Balbina, no rio Uatumã (Figura 9).

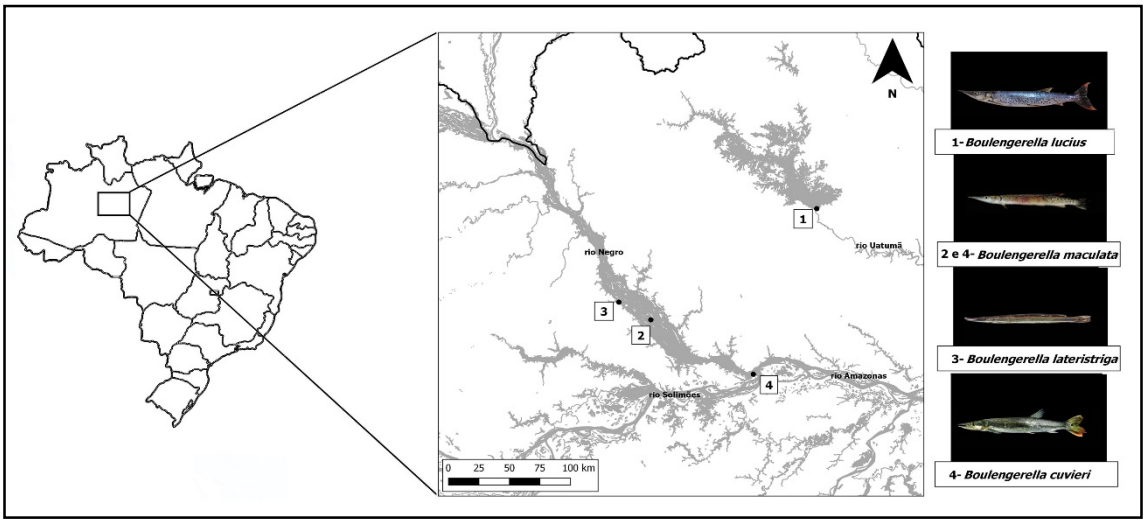


**Figura 9**. Mapa com os pontos de coleta das quatro espécies de *Boulengerella*. (1) UHE de Balbina, rio Uatumã; (2) Anavilhanas, rio Negro; (3) Novo Airão, rio Negro; (4) Catalão, baixo rio Negro.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Indução de mitoses

Para a obtenção de um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica de indução de mitoses descrita por Oliveira *et al.* (1988a), que consiste em preparar uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 20 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em estufa a 40 °C por cerca de 20 minutos e, posteriormente injetada na região intraperitoneal do animal, na proporção de 1 mL para cada100g de peso vivo. Os peixes foram mantidos em aquários aerados por um período de 24 horas antes da coleta das amostras para análise citogenética.

#### 3.2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos

As preparações para obtenção dos cromossomos mitóticos seguiram o protocolo descrito por Gold *et al*. (1990).

Vinte e quatro horas após a aplicação da solução de fermento, os peixes foram eutanasiados, procedendo-se a retirada do rim, que é o órgão hematopoiético dos peixes. O material foi transferido para uma cubeta de vidro contendo 15 mL de meio Hank's ou RPMI e o tecido foi dissociado com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, com movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células. Adicionou-se 3 a 4 gotas (ou 150µL para cada 2mL de meio de cultura) de colchicina 0,125% e o material foi ressuspendido, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur e incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos.

Após esse período o material foi transferido, com auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga e centrifugado por 10 minutos a 1250 rpm; após esse período foi retirado o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspender o material e acrescentou-se 14 mL de solução de KCL 0,075M; o material foi ressuspendido e deixado em estufa a 37 ºC por 40 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético), seguindo-se nova centrifugação por 10 minutos a 1250 rpm.

O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspender o material, sendo acrescentado 10 mL de fixador. Seguiu-se centrifugação adicional por 10 minutos, sendo este passo repetido mais duas vezes. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação, adicionou-se cerca de 1,5 mL de fixador, e o material foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e armazenado em freezer (-20 ºC).

**Técnicas citogenéticas clássicas**

### 3.2.3. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONs

Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980), com algumas modificações. Sobre as lâminas com a suspensão celular foram adicionadas 2 a 3 gotas de solução coloidal de gelatina (2g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 100 mL de água destilada, acrescida de 1mL de ácido fórmico) e duas gotas de solução aquosa de nitrato de Prata ($AgNO_3$) a 50%. As duas soluções foram cuidadosamente misturadas agitando-se levemente a lâmina.

O material foi recoberto por lamínula e a lâmina foi colocada em câmara úmida, em estufa a 50 °C, durante 3 a 8 minutos. Após esse tempo, quando o material adquiriu

uma coloração marrom dourada, a lâmina foi lavada em água destilada, retirando-se a lamínula, e seca ao ar.

### 3.2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva

Para a detecção da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações. As lâminas com a suspensão celular foram tratadas com HCl 0,2N a 45 °C, por 2 minutos e, posteriormente, lavadas rapidamente em água destilada à temperatura ambiente e secadas ao ar. Após isso, as lâminas foram incubadas por cerca de 35 segundos em solução de hidróxido de Bário 5%, recém-preparada e filtrada, a 42 °C. Posteriormente, a lâmina foi rapidamente emergida em solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente, lavada em água destilada e deixada secar ao ar. Após a secagem, 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, durante 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e secadas ao ar. Seguiu-se a coloração do material com solução de iodeto de Propídio (20 µL de antifade e 1 µL de iodeto).

### 3.2.5. Coloração por fluorocromos base-específicos DAPI (AT-específico) e Cromomicina $A_3$ (GC–específico)

Para coloração com cromomicina $A_3$ ($CMA_3$) foi utilizada a técnica descrita por Sola (1992) com algumas modificações. As preparações foram inicialmente tratadas com uma solução de Distamicina A (0,3 mg/mL) durante 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em tampão McIlvaine e seca ao ar. A seguir, o material foi tratado com uma solução de $CMA_3$ (0,5 mg/mL) durante 60 minutos (no escuro), lavado em tampão McIlvaine e seco ao ar. Foram aplicados 40 µL de uma solução de DAPI (1,2 µg/mL) + Antifading (Vectashield) sobre a lâmina. O material foi coberto com uma lamínula de vidro e estocado (no escuro) por aproximadamente 30 dias, para a estabilização da fluorescência. A análise foi realizada em microscopia de epifluorescência, com filtro de 450-490 nm.

### 3.2.6. *Fiber*-FISH

Para realização da técnica de *Fiber*-FISH foi utilizado o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. As lâminas com a suspensão celular foram lavadas com solução salina (PBS 1x) durante um minuto à temperatura ambiente, seguindo-se o tratamento por uma série alcoólica (70%, 85% e 100%), dois minutos cada. Na parte superior das lâminas (anteriormente secas e na posição horizontal) foram adicionados 400

μL de hidróxido de Sódio (NaOH) 0,5 M, diluído em álcool a 30%. Inclinou-se a lâmina em 40° e fez-se um arrasto com o auxílio de uma outra lâmina, para que ocorresse o alongamento das fibras dos núcleos interfásicos. Após esse procedimento, aplicaram-se imediatamente 500 μL de etanol a 100% sobre a lâmina inclinada até sua evaporação completa. Este procedimento de fixação aumenta o número de pontos de fixação entre as fibras de DNA e a superfície da lâmina.

### 3.2.7. Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada a partir do tecido muscular de *Boulengerella* cuvieri, utilizando o protocolo de Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Foram macerados aproximadamente 20mg de tecido muscular e transferidos para um tubo de volume de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 500 μL de tampão de lise Tris-HCl 10mM em pH 8,0, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, SDS 1%, conforme Estoup *et al.* (1993). Posteriormente foram acrescentados 15 μL de proteinase K 10 mg/mL e 6 μL de RNAse (10 mg/mL). As amostras foram incubadas a 60 ºC por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido. Foram adicionados 100 μL de acetato de Amônio 3M, 1 volume 600 μL de fenol-clorofórmio (1:1). Após agitação por inversão durante alguns minutos, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionados 600 μL de clorofórmio, misturando-se cuidadosamente, por alguns minutos, por inversão. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram acrescentados 100 μL de acetato de Amônio 3M, 1 volume 600 μL de isopropanol gelado e misturados gentilmente por inversão. O precipitado foi deixado a -20 °C por cerca de 14 horas. O material foi retirado do freezer e então centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 1 mLde etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* foi seco em estufa a 55 °C, ressuspendido em 100 μL de TE 0,2X ou água milli-Q e deixado eluindo por 14 horas. Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do DNA extraído, este foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

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

Para obtenção de sondas de DNAr 5S e 18S foi utilizado o DNA genômico extraído do músculo de *Boulengerella cuvieri*. As sondas foram obtidas por amplificação,

por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme Saiki *et al.* (1988), utilizando os *primers*:

a) DNAr 5S: 5S a (5' -TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5S b (5' – CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Martins e Galetti 1999);

b) DNAr 18S f (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT- 3') e 18S r (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010);

As amplificações para sequências teloméricas foram feitas em ausência de DNA, com os *primers* (TTAGGG) 5 e (CCCTAA) 5 (Ijdo *et al*. 1991).

A sequência de DNA satélite 5S*Hin*dIII-DNA, com 360 pb, é composta de um segmento com 95 pb, com similaridade ao gene de RNAr 5S e um segmento com 265 pb, similar ao NTS da primeira sonda. As sondas foram previamente clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em *Escherichia coli* DH5 (Martins *et al*. 2006).

As reações de PCR foram feitas em um termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient. O Mix foi preparado em um volume final de 15 µL: 1 µL de DNA genômico 300ng; 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de Magnésio 1,5 mM; 0,15 µL de Taq DNA polimerase 5U/µL; 3,0 µL de dNTP 1 mM; 0,6 µL de cada *primer* 5 mM; água milli-Q para completar o volume final.

Os fragmentos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, corados com Gel *Red* (*Biotium*) para a verificação quanto ao grau de integridade do DNA. Os produtos de PCR foram utilizados como sondas para hibridização dos cromossomos metafásicos, após marcação.

Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas:

a) DNAr 5S: 2 minutos a 95 ºC (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 0:30 a 59 °C (anelamento dos *primers*), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), e 5 minutos a 72 °C (extensão final).

b) DNAr 18S: 2 minutos a 95 ºC (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 0:30 a 59 °C (anelamento dos *primers*), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), e 5 minutos a 72 °C (extensão final).

c) Sequências teloméricas: 2 minutos a 95 ºC (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 0:30 a 59 °C (anelamento dos *primers*), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), e 5 minutos a 72 °C (extensão final).

### 3.2.9. Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pelo método de *nick translation*, utilizando biotina 14-dATP (Bio-Nick Translation mix Roche) e/ou digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix Roche). Para tanto, em um tubo Eppendorf de 1,5 mL, foi preparada uma solução contendo 1 µL de mix dNTP 10x; 1 µL de sonda de DNA 200 ng/ µL; 1 µL de mix de enzima 10x; 6 µL de água milli-Q, totalizando 9 µL para cada lâmina a ser hibridizada.

Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 ºC por 90 minutos no termociclador e posteriormente mantida em freezer para posterior utilização.

### 3.2.10. Hibridização por fluorescência *in situ* – FISH com duas sondas (Double FISH)

Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. Foram utilizadas como sondas, sequências teloméricas e DNA ribossomais obtidos por PCR.

### 3.2.11. Tratamento das lâminas

As lâminas foram incubadas em solução de HCl 0,2N por 2 minutos e lavadas com água destilada e secas ao ar. Após esse período foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente e desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%), durante 5 minutos e secas ao ar.

### 3.2.12. Pré-hibridização

As lâminas foram desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 ºC por 3 minutos e novamente desidratadas em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada.

### 3.2.13. Solução de hibridização

Em um tubo Eppendorf foram adicionados 4 µL da sonda 1; 4 µL da sonda 2; 20 µL de formamida; 8 µL de sulfato de dextrano 50% e 4 µL de 20xSSC. O material foi

desnaturado a 99 °C por 10 minutos em um termociclador e transferido imediatamente ao gelo.

### 3.2.14. Hibridização

Foram adicionados 40 µL de solução de hibridização sobre uma lamínula e a lâmina foi alocada invertida sobre a mesma. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (água destilada) a 37 °C por cerca de 14 horas.

### 3.2.15. Lavagens das lâminas

As lamínulas foram removidas das lâminas e estas lavadas em formamida 15% a 42 °C, durante 6 minutos. Em seguida, foi lavada em solução *Tween* 0,5%, durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

### 3.2.16. Detecção do sinal de hibridização

As lâminas foram incubadas em tampão NFDM (*nonfat dry milk*) por 15 minutos. Após, foram lavadas duas vezes com solução *Tween* 5% por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram colocadas sobre cada lâmina 20 µL de anti digoxigenina-rodamina e 100 µL de uma solução contendo tampão NFDM e estreptavidina conjugada ao fluorocromo FITC (2 µL de estreptavidina estoque em 998 µL de NFDM). Em seguida, as lâminas foram cobertas por lamínula e deixadas por 60 minutos em câmara úmida com água destilada. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas três vezes em solução *Tween* 5% por 2 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica de Etanol 70%, 85% e 100% durante 5 min cada e secadas ao ar.

### 3.2.17. Montagem das lâminas

Sobre cada lâmina adicionou-se solução de DAPI diluída em antifade *VectaShield* (20 µL de *antifade* e 1 µL de DAPI).

### 3.2.18. Análises cariotípicas

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio de luz foi estabelecido o número diploide modal e suas frequências relativas para cada indivíduo. Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas. As melhores metáfases foram analisadas e capturadas em fotomicroscópio de epifluorescência, em objetiva de imersão. Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa *Adobe Photoshop 7.0*, versão CS4, a partir dos cromossomos metafásicos, os quais foram recortados e emparelhados.

Os cromossomos foram medidos, utilizando o programa *Image J*, agrupados de acordo com sua morfologia e organizados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinadade acordo com os critérios de relação de braços (RB=BM/Bm, onde BM = braço maior e Bm = braço menor) segundo Levan *et al*. (1964). Os cromossomos foram separados em metacêntricos (m), com RB=1,00 a 1,70, submetacêntricos (sm), com RB=1,71 a 3,00, subtelocêntricos (st), com RB=3,01 a 7,00 e acrocêntricos (a), com RB > 7,00. O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se os metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como tendo dois braços e acrocêntricos como tendo apenas um braço.

## 4. Resultados e Discussão

Os resultados e sua discussão estão sendo apresentados na forma de um artigo científico, a ser submetido para publicação.

Evolutionary relationships among *Boulengerella* species (Ctenoluciidae, Characiformes): Genomic organization of repetitive DNAs and highly conserved karyotypes.

José Francisco de Souza e Sousa, Patrik Ferreira Viana, Luiz Antônio Carlos Bertollo, Marcelo de Bello Cioffi, Eliana Feldberg

**Resumo**

A família Ctenoluciidae tem sido considerada o provável grupo-irmão das famílias Erythrinidae, Lebiasinidae e Hepsetidae. O gênero *Boulengerella* possui cinco espécies válidas, popularmente conhecidas como bicudas. No presente estudo quatro espécies: *Boulengerella cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius*e *B. maculata*, coletadas nos rios Negro e Uatumã (Amazonas, Brazil) foram analisadas citogeneticamente por procedimentos convencionais e moleculares. As quatro espécies possuem 2n=36 cromossomos (14m+16sm+6st e NF=72). O padrão heterocromático foi espécie-específico, com bandas C-positivas nas regiões centroméricas e bitelomérica de vários cromossomos, além de alguns blocos intersticiais. A região organizadora do nucléolo (RON) foi localizada na constrição secundaria terminal, nos braços longos do par 18, nas quatro espécies, sendo confirmada pelo mapeamento do DNAr 18S. O DNAr 5S foi localizado em dois pares cromossômicos: na região terminal do braço longo do par 1 nas quatro espécies e na região centromérica do par 10 em *B. lateristriga*, *B. maculata* e *B. cuvieri* e do par 4 em *B. lucius*. A sonda telomérica destacou regiões terminais em todos os cromossomos, com um grande acúmulo no par 18, coincidente com a RON, bem como uma sequência intersticial (ITS) na região centromérica do par 3 de *B. lateristriga*, *B. maculata* e *B. cuvieri*. Nenhuma região positiva para 5S HindIII foi evidenciada. As características cromossômicas indicam um conservadorismo para este gênero, a exceção do padrão heterocromático que foi espécie-específico. É notável um particular heteromorfismo cromossômico do par 18, nos exemplares machos das quatro espécies, onde um dos homólogos é bem maior que o outro, sugerindo um possível sistema de cromossomos sexuais XX/XY.

**Palavras chave:** Peixes amazônicos, estudos citogenéticos, marcadores cromossômicos clássicos e moleculares, análises evolutivas.

## Introdução

Ctenoluciidae (Teleostei, Characiformes) é uma família de peixes Neotropicais restrita à água doce, onde suas espécies são popularmente conhecidas como “bicudas”, devido à sua mandíbula e focinho alongados. Esta família tem sido alocada dentro da superfamília Erythrinoidea, onde também se incluem as famílias Erythrinidae, Lebiasinidae e Hepsetidae (Lucena 1993; Vari 1995; Buckup 1998; Oyakawa 1998). Atualmente, Ctenoluciidae compreende dois gêneros: *Ctenolucius* com duas espécies (*C. beani* e *C. hujeta*) e *Boulengerella*, com cinco espécies válidas (*B. cuvieri, B. lateristriga, B. lucius, B. maculata e B. xyrekes*) (Vari 1995; 2003).

*Ctenolucius* é descrito para os rios do Panamá, da Colômbia e da Venezuela (Santos *et al*. 1984; Vari 1995; 2003). As espécies de *Boulengerella* apresentam uma distribuição mais ampla, ocorrendo em diferentes drenagens amazônicas, como os rios das Guianas, Orinoco, Oiapoque, Negro, Amazonas e Tocantins. Esses peixes possuem numerosos dentes cônicos voltados para trás e são excelentes saltadores, sendo considerados predadores topo de cadeia. Habitam águas lênticas e de correntezas, preferencialmente com baixa turbidez, devido ao seu comportamento de predador visual (Santos *et al*. 1984; Vari 1995; 2003; Queiroz *et al.* 2014).

Dados moleculares e citogenéticos para alguns grupos dessa superfamília ainda são escassos, sendo Erythrinidae a família mais estudada até o momento. Esta família é composta por três gêneros, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, ocorrendo por toda a América do Sul e apresentando uma enorme diversidade de cariótipos entre diferentes populações da mesma espécie, compreendendo cariomorfos distintos. Estudos anteriores demonstraram que alguns cariomorfos de *E. erythrinus* e *H. malabaricus* possuem cromossomos sexuais heteromórficos bem diferenciados, enquanto que em outros cariomorfos esses cromossomos ainda se encontram em estado indiferenciado (Bertollo 2007). Esta família também representa a única dentro de Erythrinoidea, na qual estudos de citogenética molecular (mapeamento de sequências de DNAs repetitivos e experimentos de pintura cromossômica) foram realizados, evidenciando os processos envolvidos na diversificação cariotípica e na evolução dos cromossomos sexuais em suas espécies (revisado em Cioffi *et al.* 2012).

Entretanto, a ausência de dados moleculares e citogenéticos para as demais famílias, somada a algumas divergências existentes sobre o posicionamento filogenético entre os Erythrinoidea (Lucena 1993; Vari 1995; Buckup 1998; Lucena e Menezes 1998;

Calcagnotto *et al.* 2005; Netto-Ferreira 2006; 2010), deixam ainda em aberto as reais relações evolutivas entre esses diferentes grupos de nossa ictiofauna. Oliveira *et al.* (2011), com base em dados moleculares, sugeriram que Ctenoluciidae, juntamente com Lebiasinidae, formariam um clado considerado grupo irmão da superfamília Characoidea, proposta esta corroborada por Nelson *et al.* (2016).

Assim sendo, considerando a escassez de informações citotaxonômicas que poderiam possibilitar um melhor entendimento das interrelações dos Ctenoluciidae com as demais famílias de Erythrinoidea, o presente estudo buscou investigar espécies de *Boulengerella* que ocorrem na Amazônia Central, por procedimentos da citogenética clássica (coloração Giemsa e $CMA_3$, bandamento C e RON) e molecular (mapeamento de diferentes sequências de DNA repetitivo) em quatro espécies. Objetivou-se a obtenção de marcadores cromossômicos resolutivos que possibilitem uma análise comparativa entre essas espécies, assim como com espécies de famílias relacionadas, contribuindo assim para o esclarecimento das suas relações evolutivas.

**Material e métodos**

Quatro espécies de *Boulengerella*, dentre as cinco que ocorrem na região Amazônica, foram analisadas: *B. cuvieri, B. lateristriga, B. lucius* e *B. maculata.* A amostragem analisada e os dados relativos aos locais de coleta de cada espécie, encontram-se na Tabela 1 e Figura 9. Os peixes foram coletados sob autorizações do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, de acordo com as licenças Nº 28095-1 e 53878-2 e depositados na Coleção Ictiológica do INPA. Os peixes foram eutanasiados, seguindo as recomendações das Diretrizes Brasileiras da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013) e licenciado CEUA-INPA.

Tabela 1. Espécies analisadas, número de indivíduos e local de coleta. * Material em processo de depósito na coleção ictiológica do INPA.

| **Espécie** | **Número de indivíduos** | **Local de coleta** | **Coordenadas** | **Voucher*** |
|---|---|---|---|---|
| *B. cuvieri* | 6 ♂, 8 ♀ | Lago Catalão (Rio Negro) | 3°10'30.8"S 59°56'30.3"W | |
| *B. lateristriga* | 7 ♂, 7 ♀ | Novo Airão (rio Negro) | 2°37'28,5"S 60°58'16,8"W | |
| *B. lucius* | 4 ♀ | UHE de Balbina (rio Uatumã) | 1°55'02.2"S 59°28'23.7"W | |
| *B. maculata* | 7 ♂, 8 ♀ | Lago Catalão e Anavilhanas (Rio Negro) | 3°10'30,8"S 59°56'30.3"W; 2°33'28.4"S 60°46'29.7"W | |

Para obtenção de um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica de indução de mitose, descrita por Oliveira *et al*. (1988a) e para obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica descrita por Gold *et al*. (1990).

As regiões organizadoras de nucléolo foram detectadas por impregnação com nitrato de Prata (Ag-RON), conforme protocolo de Howell e Black (1980). A heterocromatina C-positiva foi localizada de acordo com Sumner (1972), com pequenas modificações.

Para coloração com cromomicina $A_3$ ($CMA_3$) foi utilizada a técnica descrita por Sola *et al.* (1992), com algumas modificações. As preparações foram inicialmente tratadas com uma solução de DistamicinaA (0,3 mg/mL) durante 15 minutos, em temperatura ambiente, lavadas em tampão McIlvaine e secas ao ar. A seguir, o material foi tratado com solução de $CMA_3$ (0,5 mg/mL) durante 60 minutos (no escuro), lavado em tampão McIlvaine e seco ao ar. Foram aplicados 40 µL de solução de DAPI (1,2 µg/mL) + Antifading (Vectashield) sobre a lâmina. O material foi coberto com uma lâminula de vidro e estocado no escuro, por aproximadamente 30 dias, para a estabilização da fluorescência. A análise foi realizada em microscopia de epifluorescência, com filtro de 450-490 nm.

**Preparação e marcação das sondas**

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular preservado em etanol 100%, utilizando o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). O DNAr 18S e o DNAr 5S foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT- 3') e 18Sr (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010) e 5Sa (5' -TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5Sb (5' -CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Martins e Galetti 1999). Já, as sondas do DNA satélite 5S*Hind*III foram previamente clonadas em vetores plasmidiais e propagadas em *Escherichia coli* DH5α (Martins *et al.* 2006).

A sonda de DNAr 5S foi marcada por *nick-translation* com biotina-14-dATP, de acordo com especificações do fabricante (Bionick Labeling System, Invitrogen, San Diego, CA, USA). As sondas de DNAr 18S e 5S*Hind*III-DNA foram marcadas por *nick-translation* com DIG-11-dUTP, de acordo com especificações do fabricante (Roche, Mannheim, Germany). Adicionalmente, uma sonda de DNA telomérico $(TTAGGG)_n$ foi gerada por PCR (PCR FITC-Probe Synthesis Kit, Roche) na ausência de um DNA molde, utilizando os *primers* $(TTAGGG)_5$ e $(CCCTAA)_5$ (Ijdo *et al.* 1991).

**Hibridização Cromossômica**

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada sob altas condições de extringência (Pinkel *et al.* 1986). Os cromossomos foram incubados com RNAse (40 µg/mL) por 1 hora à 37 °C. Após a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%, 2 × SSC à 70°C, as preparações foram incubadas em 2 x SSC por 4 min à 70 °C. A mistura de hibridização (100 ng da sonda desnaturada, 10 mg/mL de sulfato de dextrano, 2 × SSC e formamida 50% em um volume final de 30 µL) foi aplicada sobre as lâminas e a hibridização foi realizada durante uma noite à 37 °C, em uma câmara úmida contendo 2 x SSC. Duas lavagens pós-hibridização foram realizadas em um agitador (150 rpm) à 37 °C, a primeira em formamida 50%, 2 × SSC por 15 min, e a segunda em 2 × SSC por 15 min. A lavagem final foi realizada em 4 × SSC a temperatura ambiente, por 15 min. Avidina-FITC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada para a detecção do sinal da sonda de DNAr 5S e anti-digoxigenina rodamina (Roche, Mannheim, Alemanha) foi utilizada para detectar as sondas de DNAr 18S e 5S*Hind*III-DNA. Os cromossomos foram corados com DAPI (1,2 µg/mL) em solução de *Antifading* (Vector, Burlingame, CA, EUA).

***Fiber*-FISH**

Para realização da técnica de *Fiber*-FISH foi utilizado o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. As lâminas foram lavadas com solução salina (PBS 1x) durante um minuto à temperatura ambiente, seguida de uma série alcoólica de Etanol (70%, 85% e 100%) dois minutos cada. Na parte superior das lâminas (anteriormente secas e na posição horizontal) foram adicionados 400 μL de uma solução de hidróxido de Sódio 0,5 M (NaOH), diluído em álcool a 30%. Inclinou-se a lâmina em 40° e fez-se um arrasto com o auxílio de uma outra lâmina para que ocorresse o alongamento das fibras. Após esse procedimento aplicou-se imediatamente 500 μL de etanol a 100% sobre a lâmina inclinada, até a evaporação completa. Este procedimento aumenta o número de pontos de fixação entre as fibras de DNA e a superfície da lâmina. Em seguida foi realizado o procedimento da FISH com as sondas DNAr 18S e telomérica.

**Análise dos Resultados**

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em microscópio de campo claro, estabelecendo-se o número diploide modal de cromossomos para cada espécie. Cerca de 30 células foram analisadas para cada metodologia proposta. As imagens das melhores metáfases foram capturadas com a utilização do software CoolSNAP-pro, Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetic). As preparações com fluorocromos e hibridização fluorescente *in situ* foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx50, com os filtros apropriados, sendo as imagens capturadas também com a utilização do mesmo software. Os cromossomos foram classificados conforme a relação de braços (Levan *et al*. 1964), sendo classificados em metacêntricos (m), com RB=1,00 a 1,70, submetacêntricos (sm), com RB=1,71 a 3,00, subtelocêntricos (st), com RB=3,01 a 7,00 e acrocêntricos (a), com RB > 7,00. O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se os metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como tendo dois braços e acrocêntricos como tendo apenas um braço.

**Resultados**

As quatro espécies analisadas apresentaram 2n=36 cromossomos, sendo o cariótipo composto por 14m+16sm+6st e número fundamental (NF) =72 (Figura 10 a, d, g, j).

As regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) encontram-se localizadas nos braços longos do par cromossômico 18, coincidentemente com uma constrição secundária a qual apresenta um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos nos espécimes machos (Figura 10 c, f, i, l). A RON foi confirmada pelo mapeamento do DNAr 18S (Figura 11 a, c, e, g; par 18 do outro sexo em destaque) e pela coloração com Cromomicina $A_3$ ($CMA_3$) (Figura 13, destacando a espécie *B. lateristriga*).

A distribuição da heterocromatina C-positiva evidenciou um padrão centromérico e bitelomérico na maioria dos cromossomos nas quatro espécies, com acúmulo diferencial entre machos e fêmeas no par nucleolar (par 18). Entretanto, alguns cromossomos também apresentam blocos heterocromáticos espécie-específicos, a exemplo de marcações intersticiais nos braços longos dos pares 12 e 13 de *B. lateristriga*, do par 8 de *B. lucius*, dos pares 9, 13, 15, 16 de *B. cuvieri*, assim como no braço curto do par 8 desta última espécie, conforme evidenciado na Figura 10 (b, e, h, k).

O mapeamento do gene ribossomal 5S evidenciou marcação terminal nos braços longos do par 1 nas quatro espécies e uma marcação pericentromérica no par 10 nas espécies *B. lateristriga*, *B. cuvieri*, *B. maculata* e pericentromérica no par 4 em *B. lucius* (Figura 11 a, c, e, g - coluna esquerda). Marcações de 5SHindIII-DNA não foram evidenciadas em nenhuma das espécies analisadas.

Sequências $(TTAGGG)_n$ mostraram-se presentes em todos os cromossomos na região terminal, assim como em sítios intersticiais (ITS) no par 3, exceto em *B. lucius*. Um acúmulo incomum destas sequências foi evidenciado na constrição secundária do par 18 (Figura 11 b, d, f, h - coluna direita).

A *fiber-FISH*, utilizando sonda de DNAr 18S e sonda $(TTAGGG)_n$, evidenciou sequências de DNAr 18S entre dois blocos de sequências teloméricas nos machos e fêmeas de *B. lateristriga*, o que difere das demais espécies analisadas, onde estes dois tipos de sequências se apresentam intercalados (Figura 12).

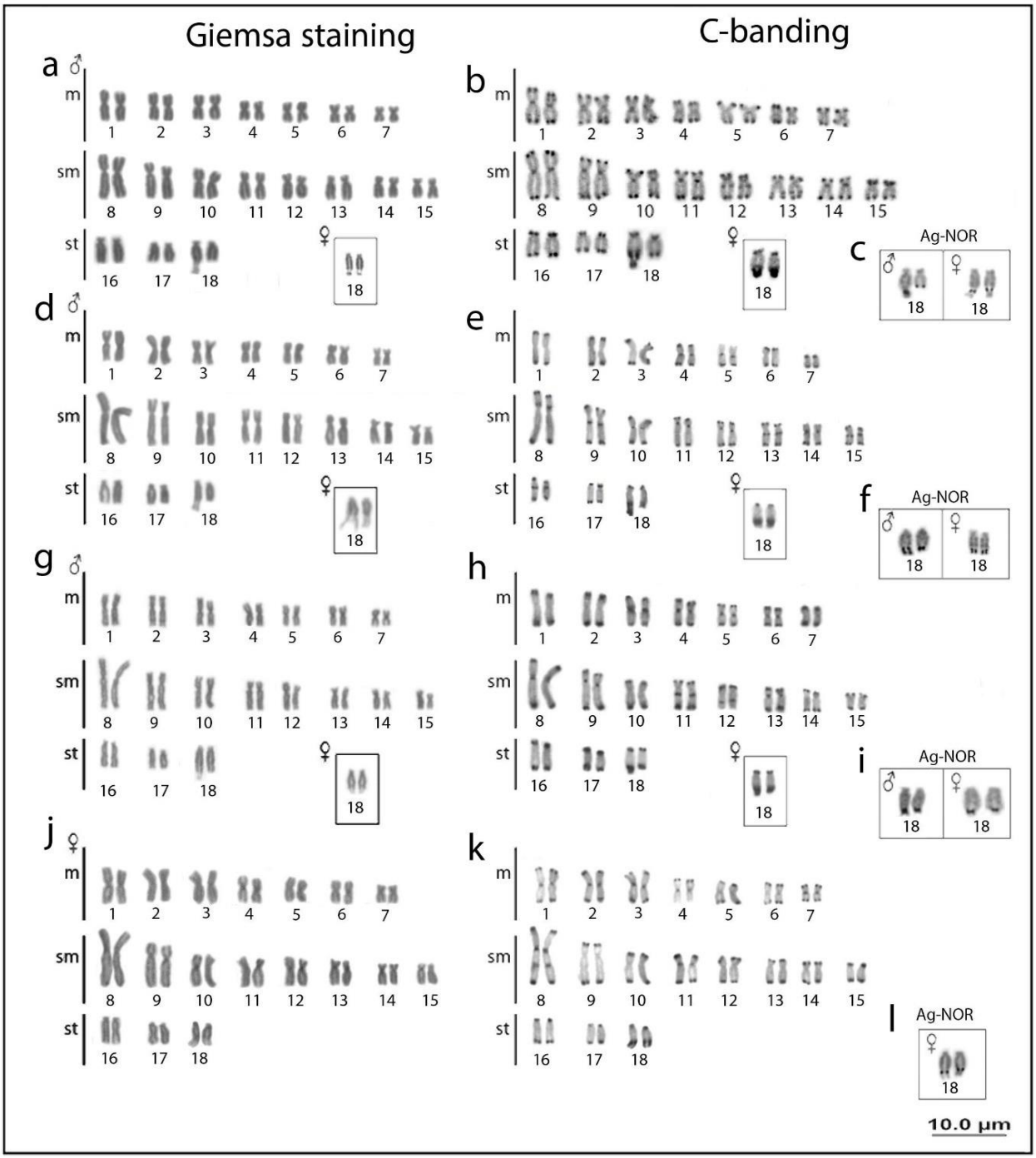


**Figura 10**: Cariótipo das espécies analisadas em coloração convencional com Giemsa, bandeamento C e Ag-RON: (a, b, c) *B. lateristriga*; (d, e, f) *B. cuvieri*; (g, h, i) *B. maculata*; (j, k, l) *B. lucius*. Em destaque o par 18, evidenciando o heteromorfismo da constrição secundária e RON nos espécimes machos.

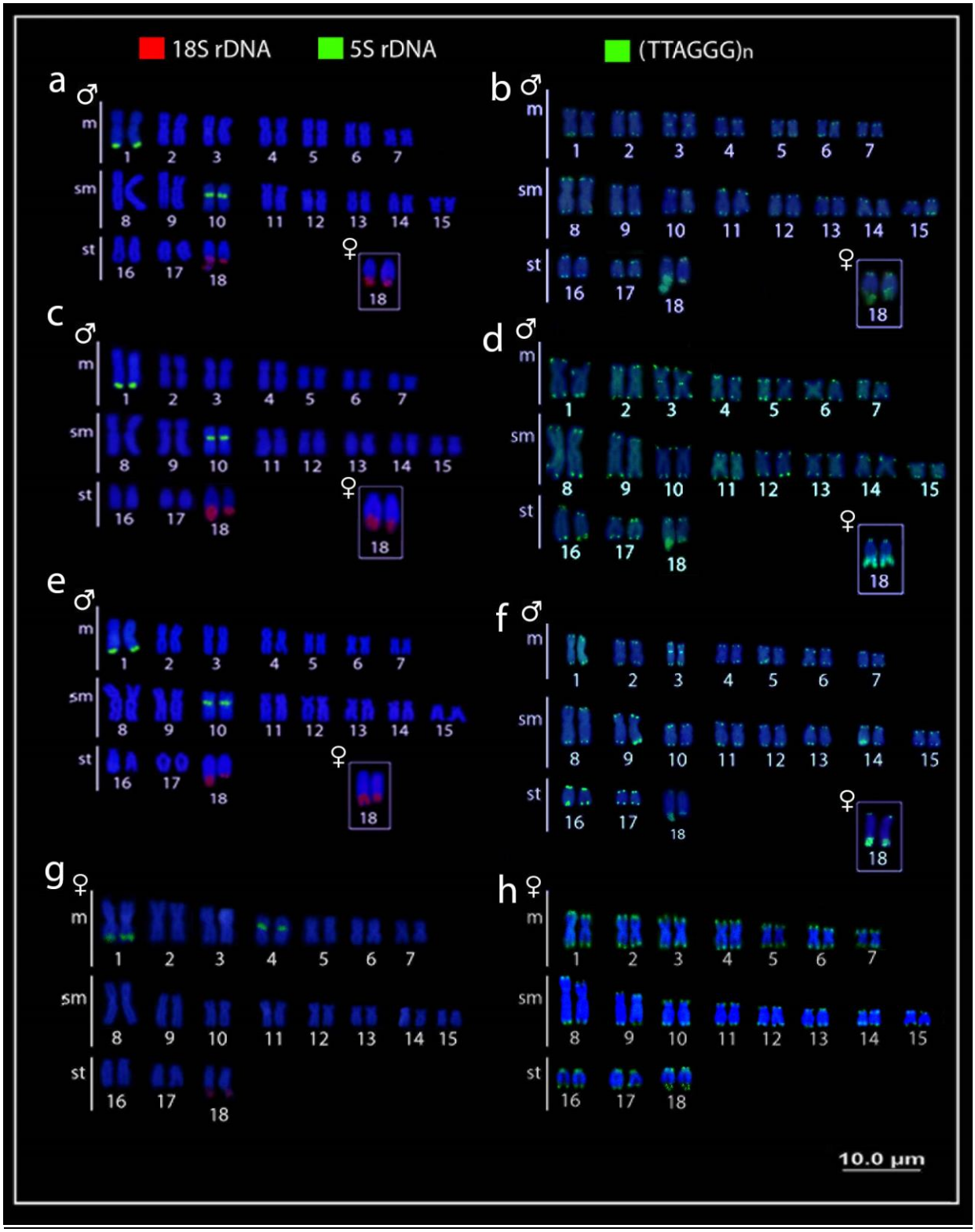


**Figura 11**: Cariótipos das espécies analisadas com marcadores cromossômicos moleculares. “double” FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (a, c, e g). FISH com sonda (TTAAGG)n (verde) (b, d, f, h). *B. lateristriga* (a-b); *B. cuvieri* (c-d); *B. maculata*(e-f); *B. lucius*(g-h).

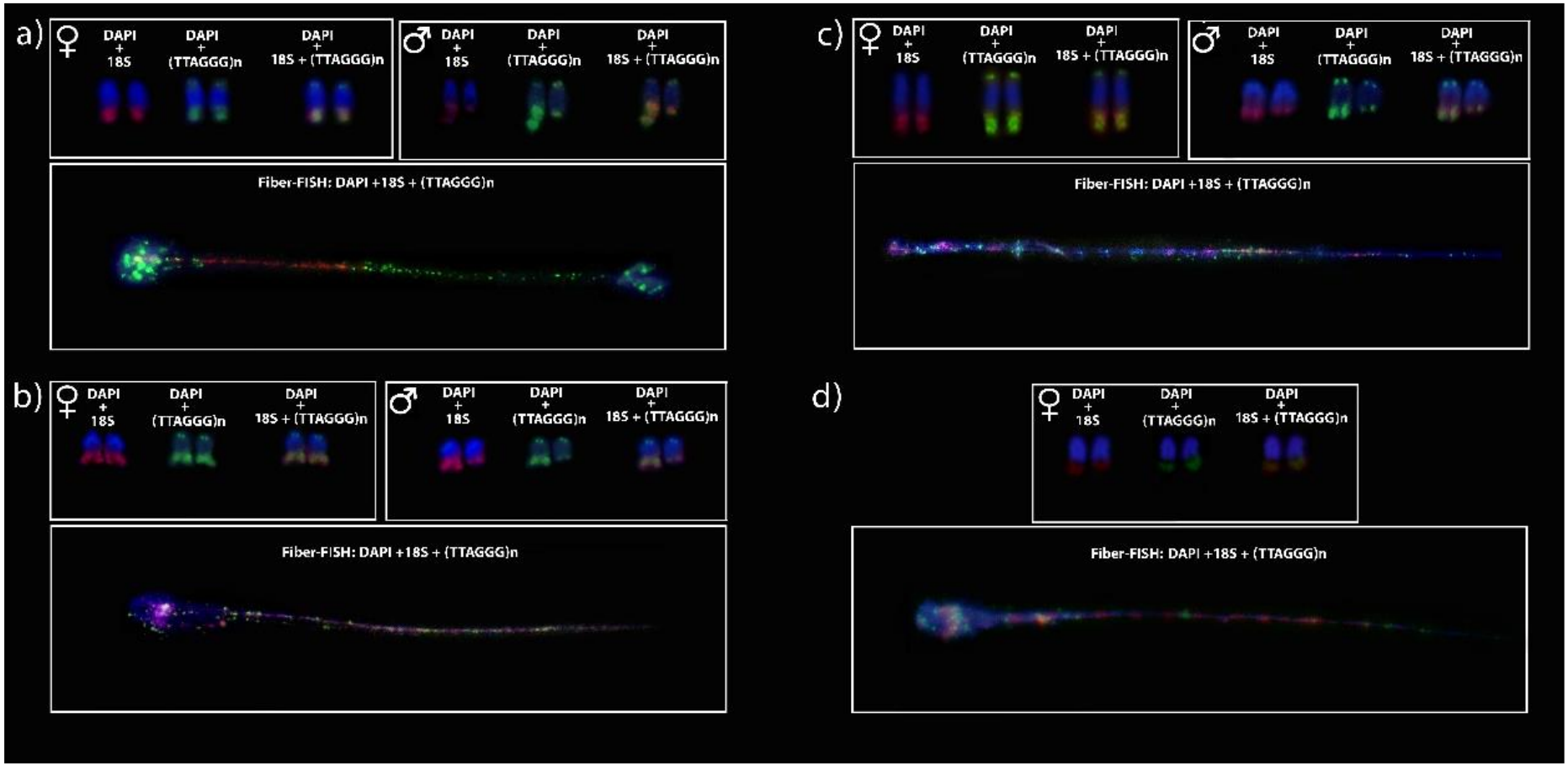


**Figura 12**: *Fiber*-FISH nas espécies analisadas, utilizando sonda de DNAr 18S (vermelho) e $(TTAGGG)_n$ (verde): a) *Boulengerella lateristriga*, (b) *B. cuvieri*, (c) *B. maculata*, (d) *B. lucius*

Em *B. lateristriga*, o bloco heterocromático, coincidente com a RON (par 18), foi o único segmento que se apresentou rico em GC pela coloração com o fluorocromo base-específico Cromomicina $A_3$ (Figura 13).

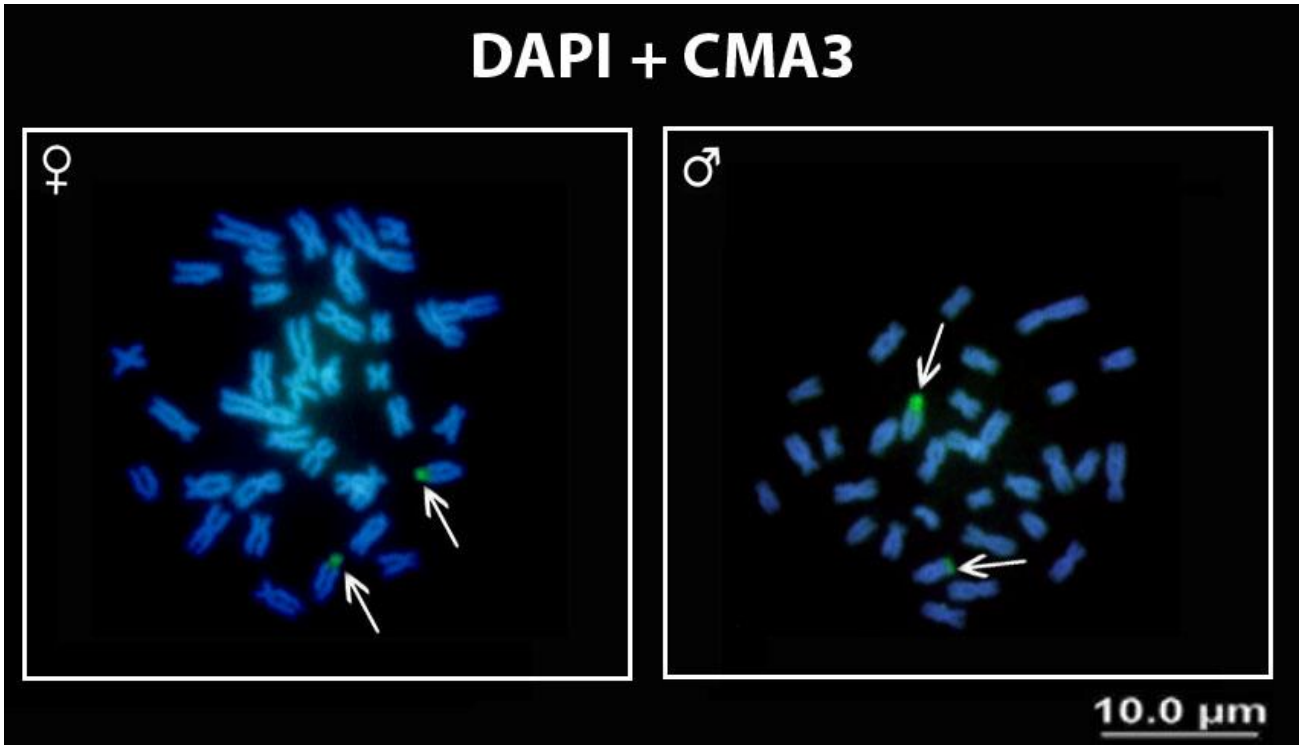


**Figura 13.** Metáfase de fêmea e macho de *B. lateristriga* em coloração pelo fluorocromo Cromomicina $A_3$, evidenciando sítios GC-positivos correspondentes à localização da região organizadora de nucléolo (RON) (verde).

**Discussão**

Atualmente, duas linhas distintas de evolução cromossômica vêm sendo propostas para os Characiformes, onde alguns grupos apresentam uma alta variabilidade cromossômica numérica e estrutural (*e.g.* Erythrinidae e Characidae) e outros um conservadorismo na macroestrutura cariotípica (2n e NF), como é o caso das famílias Anostomidae, Prochilodontidae e Hemiodontidae (revisado em Oliveira *et al*. 2005). Tal conservadorismo parece ser também o caso de Ctenoluciidae, onde se evidencia 2n= 36 para as quatro espécies de *Boulengerella* analisadas, assim como para uma das duas espécies de *Ctenolucius* (Arefjev 1990).

Algumas hipóteses preconizam que a diversificação cariotípica em peixes está intimamente relacionada ao seu comportamento ecológico, como por exemplo, grupos que possuem uma maior vagilidade tendem a apresentar padrões cariotípicos relativamente mais conservados, em contraste a grupos que apresentam baixa vagilidade,

os quais tendem a apresentar ampla variação cromossômica (Oliveira *et al*. 1988b). A formação de pequenas populações, em grupos de baixa vagilidade, muitas vezes ocasiona a interrupção do fluxo gênico entre elas, o que pode ocasionar a fixação de rearranjos cromossômicos diferenciais entre as populações, possibilitando o surgimento de padrões cariotípicos distintos, tanto numérico como estrutural, com uma consequente diversidade cariotípica. Tal é o caso que parece ocorrer entre os Erythrinoidea, onde a espécie nominal *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), que forma pequenas populações e tem baixa vagilidade apresenta extensa variação cariotípica interpopulacional (Bertollo 2007). Por sua vez, os ctenolucídeos aqui analisados, que têm alta vagilidade, apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada entre suas espécies.

Outros marcadores cromossômicos investigados também possibilitaram uma análise comparativa informativa entre as espécies de *Boulengerella* (Ctenoluciidae) e espécies de Erythrinidae, as quais correspondem às duas famílias dentre os Erythrinoidea, com dados cromossômicos disponíveis até então. Neste sentido, destaca-se a ocorrência de RONs simples nos Ctenoluciidae, em contraste com RONs múltiplas encontradas na maioria dos representantes de Erythrinidae (Dergam e Bertollo 1990; Bertollo *et al*. 1997; Born e Bertollo, 2000; Vicari *et al*. 2005, Cioffi *et al.* 2010a, Cioffi e Bertollo 2010b; Cioffi *et al*. 2011). De fato, em Erythrinidae é comum a ocorrência de RONs múltiplas, com até 8 sítios em *H. malabaricus* e *Erythrinus erythrinus*, e de 4 a 6 sítios em *Hoplerythrinus unitaeniatus*, com exceção de *H. lacerdae* que apresenta RONs simples (Bertollo 2007; Martinez *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2016). Por sua vez, o par nucleolar mostra-se homeólogo nas quatro espécies de *Boulengerella*, com um grande bloco heterocromático C-positivo e heteromórfico, quanto ao tamanho, nos espécimes machos. Tal polimorfismo está também associado com a distribuição diferencial do sitio de DNAr 18S nesta região. Tal heteromorfismo é similar ao encontrado no cariomorfo B de *H. malabaricus* (2n=42; 22m+18sm+2st, XX/XY). De fato, o padrão heterocromático deste cariomorfo apresenta, além de várias marcações centroméricas e teloméricas um bloco C-positivo conspícuo, ocupando grande parte do braço longo do cromossomo X, subtelocêntrico e um pequeno bloco distal no braço longo do cromossomo Y (Cioffi *et al.* 2010b).

A análise do DNAr 18S e 5S, por dupla-FISH, evidenciou que estes sítios se encontram em diferentes pares cromossômicos em todas as espécies de *Boulengerella.* Segundo Martins e Galleti (1999) e Martins (2007), tal característica é relativamente

comum entre os peixes de água doce, o que poderia evitar rearranjos desvantajosos entre estas duas regiões do genoma. Especificamente, quanto ao DNAr 5S, foram evidenciados sítios em dois pares cromossômicos, em posição terminal e pericentromérica, respectivamente. Entretanto, enquanto que em *B. lateristriga*, *B. cuvieri* e *B. maculata* o sítio pericentromérico situa-se no par 10, em *B. lucius*, este ocorre no par 4. Assim, embora os mecanismos evolutivos não tenham produzido grandes mudanças nos cariótipos das diferentes espécies de *Boulengerella*, seus genomas estão em evolução contínua, como demonstrado pelas variações cromossômicas em relação ao DNAr 5S, bem como em relação a alguns blocos heterocromáticos espécie-especificos. De fato, a fraçao repetitiva do genoma escapa à pressão seletiva que atua nos segmentos não repetitivos, representando assim bons marcadores evolutivos para detectar eventos recentes de evolução (Cioffi *et al.* 2009a). Neste sentido, a localização diferencial dos sítios 5S encontrada em *B. lucius* representa também um importante marcador citotaxonômico, possibilitando sua fácil diferenciação de *B. maculata*, espécies estas comumente confundidas pela sua similaridade morfológica.

Entre as espécies de Erythrinidae, o DNAr 5S apresenta uma distribuição variável em número e posição no cariótipo das diferentes espécies e cariomorfos (Cioffi *et al.* 2009a), mostrando inclusive variações entre distintas populações de um mesmo cariomorfo (Cioffi *et al.* 2009b). Em *E. erythrinus* verifica-se um aumento surpreendente de loci DNAr 5S em associação com o retrotransposon Rex3, contrastando acentuadamente com o que ocorre no cariomorfo A desta mesma espécie, que apresenta apenas dois sítios 5S (Cioffi *et al.* 2010a). Contrariamente, espécies do grupo *lacerdae* são caracterizadas por apresentarem apenas um par de cromossomos com sítios 5S em posição intersticial (de Oliveira *et al.* 2015).

Outro marcador analisado no presente estudo foi o DNA repetitivo 5S *Hin*dIII-DNA, o qual foi isolado e caracterizado a partir do genoma de *H. malabaricus* (Martins *et al.* 2006). Esta sequência compartilha semelhanças com o DNAr 5S, com localização exclusiva na região centromérica dos cromossomos (Martins *et al.* 2006). Em Erythrinidae, este marcador tem se mostrado exclusivo de *H. malabaricus* (Ferreira *et al.* 2007; Cioffi *et al.* 2009a). As espécies de *Boulengerella* também não evidenciaram marcação para esta sequência, fato que reforça a exclusividade deste marcador para *H. malabaricus*, sustentando a hipótese de que esta sequência teve uma origem independente

ou foi perdida após a divergência de *H. malabaricus* das demais espécies de Erytrhinidae (Ferreira *et al.* 2007).

O mapeamento cromossômico com sonda telomérica apresentou o padrão característico esperado, ou seja, marcações nos telômeros de todos os cromossomos. Entretanto, em *B. lateristriga, B. cuvieri* e *B. maculata* foi também evidenciado um sitio telomérico intersticial (ITS) na região centromérica do par 3. Esta ITS pode ser indicativa de rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução cariotípica deste grupo, tal como inversão ou fusão cêntrica, conforme já evidenciado para diferentes organismos (Meyne *et al.* 1990; Wiley *et al.* 1992; Rosa *et al*. 2012), ou mesmo de um procedimento da telomerase para reparar quebras cromossômicas, onde sequências teloméricas são acrecentadas a regiões não terminais dos cromossomos (Flint *et al.* 1994; Azzalin *et al.* 2001; Nergadze *et al.* 2007). Por outro lado, ITS nem sempre são passíveis de serem detectadas no cariótipo, devido à perda ou redução das sequências teloméricas durante os rearranjos cromossômicos, o que poderia explicar sua ausência em *B. lucius*, que representa a única espécie investigada com ausência de ITS. Entre os eritrinídeos, ITS têm sido correlacionadas com rearranjos cromossômicos que deram origem a sistemas de cromossomos sexuais múltiplos. Tal é o caso do cariomorfo D de *H. malabaricus*, onde uma ITS no braço longo do cromossomo neo-Y evidencia a origem deste cromossomo, a partir da fusão *in tandem* de um dos homólogos do par 20 com o cromossomo Y do cariomorfo C, originando um sistema $X_1X_2Y$ (Cioffi e Bertollo 2010a). Fato semelhante foi também encontrado em *E. erythrinus*, onde a localização de uma ITS na região centromérica do cromossomo Y corrobora a hipótese de uma fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos não homólogos, dando origem a esse cromossomo (Cioffi *et al.* 2010a).

Um acúmulo sintênico de sequências teloméricas com DNAr 18S é compartilhado pelas espécies de *Boulengerella* no par 18 do cariótipo. Adicionalmente, esta região mostrou-se rica em GC em *B. lateristriga*. Embora a associação de sequências teloméricas e ribossomais (DNAr 18S) não seja muito frequente, ela já foi observada em pelo menos 12 espécies de peixes pertencentes às ordens Anguilliformes, Mugiliformes, Salmoniformes e Syngnathiformes (Gournung *et al.* 2004; Rossi *et al.* 2005) e em três espécies de *Salvelinus* (Reed e Phillips 1995; Ocalewicz *et al.* 2004; Pomianowski *et al.* 2012). Segundo os autores, a co-localização dessas sequências nessas espécies também está associada a regiões ricas em GC, as quais estão envolvidas em vários processos de rearranjos cromossômicos e polimorfismo de tamanho e localização das RONs. Análises

de *fiber-FISH*, utilizando sondas de DNAr 18S e $(TTAGGG)_n$ confirmaram a sintenia de tais regiões em *Boulengerella*, revelando, contudo, padrões diferenciais de localização entre as espécies. Em *B. lateristriga* a sequência ribossomal 18S encontra-se localizada entre dois blocos de sequências teloméricas, enquanto que nas demais espécies essas sequências se apresentam intercaladas. É sabido que sequências teloméricas, localizadas internamente nos cromossomos são consideradas "hotspots" para recombinação, quebra e rearranjos cromossômicos (Cherry e Blackburn 1985; Wyman e Blackburn 1991; Ashley e Ward 1993; Slijepcevic 1998; Nergadze *et al.* 2007).

Merece destaque entre os resultados obtidos, o heteromorfismo de tamanho presente em um dos homólogos do par 18 nos espécimes machos das diferentes espécies de *Boulengerella*. Tal heteromorfismo se associa com a constrição secundária existente neste cromossomo, a qual se evidencia como uma região heterocromática C-positiva, rica em GC, compartilhada com a localização de sítios de DNAr 18S e acúmulo de sequências teloméricas. Tal fato assemelha-se ao que ocorre no cariomorfo B de *H. malabaricus*, onde o cromossomo X diferenciou-se do cromossomo Y por um acúmulo de heterocromatina GC positiva, associada a sítios de DNAr 18S (Born e Bertollo 2000; Cioffi *et al.* 2010a). Particularmente, este caso contrasta com a maioria dos exemplos conhecidos de evolução do par sexual, onde o cromossomo sexo-específico (Y/W) é aquele que está sujeito a um processo de diferenciação em relação ao cromossomo X ou Z (Cioffi *et al.* 2010b). O papel de sequências ribossomais no processo de evolução dos cromossomos sexuais, já foi igualmente evidenciado em outras espécies de peixes, tanto em relação a sistemas XX/XY (Reed e Philips 1995) como ZZ/ZW (Yano *et al.* 2016). Assim sendo, é sugestivo considerar que, a manutenção e a amplificação dos sítios de DNAr em apenas um dos homólogos nos machos de *Boulengerella*, em associação com sequências teloméricas, pode estar indicando um processo de diferenciação de cromossomos sexuais neste grupo, merecendo futuras investigações mais pormenorizadas neste sentido.

## 6. Conclusões

As quatro espécies de *Boulengerella* (*B. cuvieri*, *B. lateristriga*, *B. lucius* e *B. maculata*) mantêm a macroestrutura cariotípica conservativa, constrastando assim com o cenário existente entre as espécies da família Erythrinidae, filogeneticamente relacionada, onde uma elevada diversidade cariotípica inter- e intra-específica é geralmente encontrada. Entretanto, a localização da heterocromatina C-positiva e do gene de DNAr

5S, bem como a distribuição das sequências de DNAr 18S/teloméricas mostraram-se marcadores resolutivos para evidenciar processos diferenciais de evolução cromossômica entre as espécies. Contudo, nenhuma evidência de diferenciações intra-específicas, indicativas de possíveis espécies crípticas, foi detectada. O heteromorfismo cromossômico relacionado ao par nucleolar, associado com um acúmulo incomum de sequências teloméricas, é uma característica de particular interesse, propiciando subsídios para futuras investigações. De fato, tal ocorrência sugere um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, compartilhado pelo menos por três das espécies investigadas, tendo em vista que em *B. lucius* apenas espécimes fêmeas foram analisados. Neste sentido, *Boulengerella* e *H. malabaricus* (cariomorfo B) seriam portadores de um sistema XX/XY similar, no tocante ao seu processo de diferenciação, associado ao acúmulo de DNAs repetitivos em um dos cromossomos do par sexual.

## 7. Referências Bibliográficas


Albert, J.S.; Reis, R.E. 2011. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Andreata, M. 1971. Contribuição ao estudo da biologia e do cariótipo do muçum *Synbranchus marmoratus*. *Ciência e Cultura*, 23: 103-104.

Arefjev, V.A. 1990. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). *Caryologia*, 43: 291–304.

Ashley, T.; Ward, D.C. 1993. A "hot spot" of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. *Cytogenetics* and *Cell Genetics*, 62: 169–171.

Azzalin, C.M.; Nergadze, S.G.; Giulotto, E. 2001. Human intrachromosomal telomeric like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, 110: 75–82.

Barros, A.V; Sczepanski, T.S.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. 2011. Fibra-FISH revela diferentes padrões de mapeamento físico de alta resolução para o DNA repetitivo em peixes. *Aquicultura*, 322: 47-50.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinidae). *Revista Brasileira deGenética*, 1: 103-120.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira Filho, O. 1983. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces: Erythrinidae). *Cytologia*, 48: 1–12.

Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Galetti Jr, P.M. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28: 153-159.

Bertollo, L.A.C.; Fontes, M.S.; Fenocchio, A.S.; Cano, J. 1997. The $X_1X_2Y$ sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, 5(7): 493-499.

Bertollo, L.A.C.; Born, G.G.; Dergam, J.A.; Fenocchio, A.S.; Moreira-Filho, O. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603–613.

Bertollo, L.A.C.; Oliveira, C.; Molina, W.F.; Margarido, V.P.; Fontes, M.S.; Pastori, M.C.; Falcão, J.N.; Fenocchio, A.S. 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity*, 93: 228–233.

Bertollo, L.A.C. 2007. Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an overview. p. 195-211. *In:* Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish Cytogenetics*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.

Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2011. Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. *Cytogenetics Genome Research*, 132: 71-78.

Born, G.G.; Bertollo, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8: 111–118.

Buckup, P.A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). p.123–144. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Ed.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes.* Edipucrs, Porto Alegre.

Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. 2007.*Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Vol. 1. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 195pp.

Calcagnotto, D.; Schaefer, A.S.; De Salle, R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 36(1): 135-153.

Castro, D.M. 1986. Los principales peces ornamentales de Puerto Inirida. *Boletin de la Facultad de Biologia Marina*, 8: 7–14.

Cestari, A.N. 1973. Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. *In* Azevedo, T.L.; Costa, S.O.P. (Org.) *Exercícios Práticos de Genética*, p. 29-31.

Cherry, E.H.; Blackburn, J.M. 1985. The internally located telomeric sequences in the germ-line chromosomes of *Tetrahymena* are at the ends of transposon-like elements. *Cell*, 43: 747–758.

Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. 2009a. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus. BMC Genetics*, 10: 34.

Cioffi, M.B.; Martins, C.; Centofante, L.; Jacobina, U.; Bertollo, L.A.C. 2009b. Chromosomal Variability among Allopatric Populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of Three Classes of Repetitive DNAs. *Cytogenetics and Genome Research*, 125: 132–141.

Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2010a. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an $X_1X_2Y$ sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, 105: 554-561.

Cioffi, M.B.; Martins, C., Bertollo, L.A. 2010b. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish Erythrinus erythrinus. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1): 271.

Cioffi, M.B.; Camacho, J.P.M.; Bertollo, L.A.C. 2011. Repetitive DNAs and Differentiation of Sex Chromosomes in Neotropical Fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132: 188-194.

Cioffi, M.; Dorado, J.; Baeuerle, P.A.; Heeschen, C. 2012. EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*, 18(2): 465-474.

Cioffi, M.B.; Liehr T.; Trifonov V.; Molina W.F.; Bertollo L.A.C. 2013. Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: A molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenetics and genome research*, 141: 86–194.

CONCEA. 2013. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasil, Distrito Federal. 54pp.

da Rosa, R.; Laforga-Vanzela, A.L.; Rubert, M.; Martins-Santos, I.C.; Giuliano-Caetano, L. 2009. Differentiation of Y chromosome in the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex

chromosome system of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 127: 54–60.

de Oliveira, E.A.; Bertollo, L.A.C.; Yano, C.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. 2015. Comparative cytogenetics in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae) highlights contrasting karyotype evolution among congeneric species. *Molecular Cytogenetics*, 8(1): 1-10.

Dergam, J.A; Bertollo, L.A. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and alto Paraná basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, 13(4): 755-766.

Diniz, D.; Bertollo, L.A.C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia*, 56: 303-313.

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.

Ferreira, I.A.; Bertollo, L.A.C.; Martins, C. 2007. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S HindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. *Cytogenetic Genome Research*, 118: 78–83.

Flint, J.; Craddock, C.F.; Villegas, A. *et al.* 1994. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *The American Journal of Human Genetics*, 55: 505–512.

Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.D.; Toledo F.S.A. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 31(3): 137-144.

Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia*, 49: 810-813.

Galetti Jr., P.M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. p. 61-88. *In*: Guerra, M.S. (Org.). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética.

Gold, J.R.; Li, C. Shipley, N.S.; Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish cromossomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.

Gornung, E; Mannarelli, M.E; Rossi, A.R; Sola, L. 2004. Chromosomal evolution in Mugilidae (Pisces, Mugiliformes): FISH mapping of the (TTAGGG)n telomeric repeat in the six Mediterranean mullets. *Hereditas*, 140: 158–159.

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.

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.

Howells, R.G.; Rao, J.B. 2003. Prohibited exotic fshes, shellfshes, and aquatic plants found by Texas parks and wildlife personnel in Harris Country, Texas: 1995- 1996 and 2001 thorough mid-2003. *Management Data Series*, 218: 1–11.

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.

Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Lucena, C.A.S. 1993. *Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes).* Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 158pp.

Lucena, C.A.; Menezes, N.A. 1998. A phylogenetic analysis of *Roestes* Günther and Gilbertolus Eigenmann, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). p. 261-278. *In:* Malabarba, L.R.; Reis, R.E; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Ed.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS.

Lundberg, J.G. 1993. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with paradigm. p. 156-199. *In*: Goldblatt, P. (Ed.). *Biological Relationships between Africa and South America*. Yale University Press. New Haven. 630 pp.

Malabarba L.R. 1998. Monophyly of the Cheirondontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). p. 193-234. *In: Phylogeny and Classification of the Neotropical Fishes*, Porto Alegre, Edipucrs.

Malabarba, L.R.; Weitzman, S.H. 2003. Description of a new genus with six new species from Southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Série Zoologia*/Porto Alegre, 16 (1): 67-151.

Martins, C.; Galetti, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.

Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti, P.M. 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127: 133-141.

Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. p. 421-453. *In*: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). *Fish Cytogenetics*, Inc., Science Publisher, New Hampshire, USA.

Martinez, J.F.; Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O. 2016. Comparative Cytogenetics of *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) Species Complex from Different Brazilian Hydrographic Basins. *Cytogenetic and Genome Research*, 149(3): 191-200.

McPhail, J.D.; Jones, R.L. 1966. A simple technique for obtaining chromosomes from teleost fishes. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 23(5): 767-768.

Meyne, J.; Baker, R.J.; Hobart, H.H.; Hsu, T.C.; Ryder, O.A.; Ward, O.G.; Wiley, J.E.; Wurster-Hill, D.H.; Yates, T.L.; Moyziz, R.K. 1990. Distribution of non telomeric sites of the (TTAGGG)n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99: 3-10.

Morelli, S.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C. 2007. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group: a particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4): 897-903.

Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, p. 182-183.

Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.VH. 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

Nergadze, S.; Santagostino, M.; Salzano, A.; Mondello, C.; Giulotto, E. 2007. Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biology*, 8: 260.

Netto-Ferreira, A.L. 2006. *Relações filogenéticas dos gêneros de Lebiasinidae (Ostariophysi, Characiformes).* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 374pp.

Netto-Ferreira, A.L. 2010. *Revisão taxonômica e relações interespecíficas de Lebiasininae (Ostariophysi: Characiformes: Lebiasinidae).* Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 443p.

Ocalewicz K; Śliwińska, A; Jankun, M. 2004. Autosomal localization of internal telomeric sites (ITS) in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Pisces, Salmonidae). *Cytogenetics Genome Research*, 105: 79–82.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988a. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227- 236.

Oliveira, C.; Almeida- Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H.A.; Toledo Filho, S.A. 1988b. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética*,11: 577-624.

Oliveira, M.I.B.; Sanguino, E.C.B.; Falcão, J.N. 1992. Estudos citogenéticos em *Pyrrhulina* sp. (Teleostei, Characiformes, Lebiasinidae). *IV. Simp. Citogenet. Evol. E Aplic. De Peixes Neotropicais*: 13. Rio de Janeiro, RJ (abstract).

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. 2005. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. p. 1-49. *In*: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Org.). *Fish Cytogenetics*. 1ed. Enfield: Science Publisher Inc.

Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C.; Benine, R.C.; Ortí, G.; Castro, R.M.C. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 275.

Oliveira, M.L.M.D.; Utsunomia, R.; Pansonato-Alves, J.C.; Scacchetti, P.C.; Primo, C.C.; Vicari, M.R.; Foresti, F. 2016. Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, 14(2):

Ortí, G.; Meyer, A. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46: 75-100.

Oyakawa, O.T. 1998. *Relações filogenéticas das famílias Pyrrhulinidae, Lebiasinidae e Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes).* Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 200pp.

Oyakawa, O.T.; Mattox, G.M.T. 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology*, 7: 117-140.

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.

Pomianowski, L.; Jankun, M.; Ocalewicz, K. 2012. Detection of interstitial telomeric sequences in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*, Linnaeus 1758) (Teleostei, Salmonidae). *Genome*, 55: 26–32.

Porto, J.I.R.; Feldberg, E.; Nakayama, C.M.; Falcão, J.N. 1992. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Revue d'Hydrobiolgie Tropicale*, 25: 287–299.

Queiroz, L.J; Torrente-Vilara, G.; Barros, B.S.F; Vari, R.P. 2014. *Peixes do Rio Madeira*. 1. ed. São Paulo: Dialeto, v. 2. 91pp.

Reed, K.; Phillips, R.B. 1995. Molecular cytogenetic analysis of the double-CMA3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenetics Cell Genetics*, 70: 104–107.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C. 2003. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (CLOFFSCA), EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.

Rosa, R.; Rubert, M.; Martins-Santos, I.C.; Giuliano-Caetano, L. 2012. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and* Fisheries, 22: 467–475.

Rossi, A.R.; Gornung, E.; Sola, L.; Nirchio, M. 2005. Comparative molecular cytogenetic analysis of two congeneric species, *Mugil curema* and *M. liza* (Pisces, Mugiliformes), characterized by significant karyotype diversity. *Genetica*, 125: 27–32.

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.; Russel, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. (3th edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos, G.M.; Jégu, M.; Merona, B. 1984. *Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins*. Projeto Tucuruí Eletronorte/CNPq/INPA, 1.ed. Manaus/AM, 86 pp.

Santos, G.M.; Merona, B.; Juras, A.A.; Jégu, M. 2004. *Peixes do baixo rio Tocantins; 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí*. Eletronorte, Brasília. 215pp.

Scheel, J.J. 1973. Fish chromosomes and their evolution. *Internal Report of Danmarks Akvarium*, Charlottenlund, Denmark. O-50.

Slijepcevic, P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. *Chromosoma*, 107: 136–140.

Sola, L.; Rossi, A.R.; Laselli, V.; Rasch, E.M.; Monaco, P.J. 1992. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenetics Cell Genetics*, 60: 229–235.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

Uj, A. 1990. *Etude comparative de l'osteologie cranienne dês poissons de La famille Characidae et son importance phylogenetique*. Tese de Doutorado. Faculté des Scienses de I'Université de Genève.

Vari, R.P. 1995. The Neotropical Fish Family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): Supra and Intrafamilial Phylogenetic Relationships, with a Revisionary Study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 564: 1-97.

Vari, R.P.; Malabarba, L.R. 1998. Ictiologia neotropical: uma visão geral. *Filogenia e classificação de peixes neotropicais,1*, 1-12.

Vari, R.P. 2003. Family Ctenoluciidae. p. 252–253. *In:* Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C. *Check list of freshwater fishes of South and Central America.* (Ed.), Porto Alegre.

Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetic Genome Research*, 101: 24-28.

Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1): 103-110.

Weitzman, S.H. 1962. The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. *Stanford Ichthyolohy Bulletim*, 8(1): 1-77.

Wiley, J.E.; Meyne, J.; Little, M.L.; Stout, J.C. 1992. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. *Cytogenetic Cell Genetic*, 61: 55–57.

Wyman, C.; Blackburn, E.H. 1991. Tel-1 transposon-like elements of *Tetrahymena* thermophila are associated with micronuclear genome rearrangements. *Genetics*, 129: 57-67.

Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Liehr, T.; Troy, W.P.; Cioffi, M.B. 2016. W Chromosome Dynamics in *Triportheus* Species (Characiformes, Triportheidae): An Ongoing Process Narrated by Repetitive Sequences. *Journal of Heredity*, 107(4): 342-348.