

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA CONSERVAÇÃO E
BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBEv**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DE SERRALMINI
(SERRALMIDAE: CHARACIFORMES)**

ALAN GOMES DOS SANTOS

Manaus, Amazonas

Julho de 2022

ALAN GOMES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DE SERRASALMINI
(SERRASALMIDAE: CHARACIFORMES)**

Orientadora: Dra. Eliana Feldberg

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

Fonte financiadora: INCT/CNPq/FAPEAM (fase II) - Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA II

Manaus, Amazonas
Julho de 2022

ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 26 de Julho de 2022, às 08h00 (horário-Manaus) de forma remota, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO**, composta pelos seguintes Doutores, membros titulares: Josiane Baccarin Traldi; Marcelo Vicari e Nadayca Thayane Bonani Mateussi, tendo como membros suplentes: Rafaela Priscila Ota e Ramon Marin Favarato, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** do discente **ALAN GOMES DOS SANTOS**, intitulada: “**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES DE SERRASALMINI (SERRASALMIDAE: CHARACIFORMES)**”. O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Eliana Feldberg do INPA.



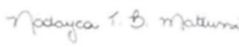
Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:


CONCEITO FINAL

<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado por unanimidade	<input type="checkbox"/> Aprovado com “Distinção e Louvor”
<input type="checkbox"/> Aprovado por maioria	
<input type="checkbox"/> Aprovado com “Distinção”	<input type="checkbox"/> Reprovado

A ata foi lavrada e assinada pelos Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

BANCA JULGADORA

NOMES	ASSINATURAS
Josiane Baccarin Traldi - UFAM	
Marcelo Vicari - UEPG	
Nadayca Thayane Bonani Mateussi - UNESP	
SUPLENTES	
Rafaela Priscila Ota - UFGD	
Ramon Marin Favarato - INPA	

Documento assinado digitalmente
 ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES
Data: 20/07/2022 18:11:44-0300
Verifique em <https://verificador.rii.br>

Zelina Estevam dos Santos Torres, Dra.
Chefe da Divisão do Programa de Pós-Graduação - PPG GCBEV
PO. Nº 577 - INPA/MCTI



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 título, 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.

S237c Santos, Alan Gomes dos
Caracterização Cromossômica de Três Espécies de Serrasalmini
(Serrasalmidae: Characiformes). / Alan Gomes dos Santos; orientadora Eliana
Feldberg; - Manaus:[s. l.], 2022.

6.5 MB
58 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Genética Conservação
e Biologia Evolutiva.) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA,
2022.

1. Piranha. 2. Evolução cromossômica. I. Feldberg, Eliana. II. Título

CDD 597.48

Sinopse

No presente trabalho, três espécies de Serrasalmini, coletadas na Amazônia, foram estudadas por meio de análises citogenéticas. Comparações interespecíficas foram realizadas em coloração convencional, distribuição da heterocromatina, regiões organizadoras de nucléolo, localização dos sítios de DNA ribossomal 18S e 5S e sequências teloméricas. Os resultados mostraram conservação no número diploide dentro de cada gênero e sintonia entre os DNA ribossomais em duas espécies.

Palavras-chave: piranha, evolução cromossômica, DNA repetitivo, sintonia, apomorfia

Dedico este trabalho a todos que compartilham um sentimento de insegurança acadêmica!

Lembre-se: *A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis,
se você lembrar de acender a luz.*

A realização deste estudo foi possível devido:

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), à Divisão de curso de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (DIGEN) e ao laboratório de Genética Animal (LGA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelas diárias utilizadas em custeio de excursões.

Aos financiamentos fornecidos pelos projetos: Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2).

Citogenética clássica e molecular em peixes da bacia amazônica frente a diferentes desafios ambientais. Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo N° 302421/2014-9.

Do CNPq pela bolsa concedida.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, por sempre me apoiar e acolher, principalmente minha mãe Auriete Gomes, minhas irmãs Márcia Gonçalves e Náyra Gomes Nobre, minhas sobrinhas Bruna Évely e Alice Victória, e ao meu pai José Domingos. Muito obrigado por tudo!

As minhas amigas e amigos que me acompanham desde a graduação e na vida, Marcella Campos, Cristiane Carvalho, Viviane Uchôa, Carlos André e Valdenor Magalhães pelo apoio e incentivo no início e durante o mestrado.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo excelente programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva e todo suporte concedido para a realização desta pesquisa. À coordenação do Programa, no nome da Dra. Eliana Feldberg e Gislene Carvalho-Zilse, por sempre estarem ao lado de seus alunos, buscando o melhor para a nossa formação.

Aos colegas de turma do mestrado – Esteban Koch, Luana Vinente, Rafaela Gurgel, Thaís Benchimol, Vanessa Sales, Gabriel Serra, Wayvin Paes, Maria Cristiane Zurra, Karol Freitas e Jefferson, pela companhia durante as disciplinas.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Animal do INPA, sob a coordenação da Dra. Eliana Feldberg, onde realizei todo trabalho necessário para a realização deste mestrado: Álex Viana, Chrystian Haerter, Érika Milena, José Souza, Josiane Traldi, Leandro Marajó, Natália Carvalho, Patrik Viana, Esteban Koch, Ana Júlia, Sandro Tonello e Simone Soares, pela companhia, conversas e conselhos.

Agradecimento mais do que especial para minha grande orientadora, Dra. Eliana Feldberg, que me acolheu em meio à pós-graduação e me auxiliou sem medir esforços para a realização deste trabalho. Tornou-se para mim uma grande “mãe científica”. MUITO OBRIGADO!!!

In memoriam




Dra. Celeste Mutuko Nakayama†
(1957-2020)

Graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Amazonas (1986), mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (1997) e doutorado em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos (2007).

Dedicou-se a diversos estudos e trabalhos, quando atuou como pesquisadora titular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Teve experiência na área de Genética, com ênfase em Citogenética de Peixes, especialmente o gênero Serrasalmus, atuando principalmente nos seguintes temas: cariótipo, banda C, cromossomos, Amazônia.

Cercado por milhões das mais perversas criaturas do planeta. Os humanos.

Newt Scamander (JK Rowling) 

Resumo

A tribo Serrasalmini (Bleeker 1859) compreende seis gêneros, com várias espécies conhecidas popularmente como “piranhas”. É um grupo diverso, distribuído pela América do Sul, que apresenta incertezas taxonômicas, sobretudo em gêneros parafiléticos, devido à grande similaridade morfológica. Diversos estudos vêm sendo realizados para solucionar e/ou compreender essa problemática, seja estudos ecológicos, morfológicos, moleculares ou citogenéticos. Abordagens de citogenética clássica e molecular já foram realizadas em algumas espécies, representando os vários clados da família Serrasalmidae, mas não todos. Com isso, este estudo objetivou caracterizar, citogeneticamente, um clado que se encontra na tribo Serrasalmini e que não tinha nenhum resultado publicado, para um melhor entendimento da evolução cromossômica da família. Três espécies, de três gêneros, foram analisadas: *Pristobrycon striolatus*, *Catoprion absconditus* e *Pygopristis denticulata*. Todas elas apresentam número diploide (2n) igual a 62 cromossomos, de um e dois braços, com fórmulas cariotípicas e número fundamental espécie-específicos. O padrão da heterocromatina foi evidenciado em regiões centroméricas e terminais (biteloméricas) na maioria dos cromossomos, além de um bloco conspicuo intersticial no par 1(m) nas três espécies. As Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RON) foram múltiplas e positivas para banda C, tendo sua localização confirmada pelo mapeamento do DNA ribossomal 18S. Entretanto, sítios adicionais de DNAr 18S foram evidenciados. O DNAr 5S foi localizado em um par cromossômico, intersticial no braço longo, correspondendo ao par 1(m), nas três espécies. Ainda, evidenciamos sintenia entre 18S e 5S nas espécies *C. absconditus* e *P. denticulata* que, de acordo com a FISH em fibras estendidas, estão intercaladas. Sequências teloméricas foram detectadas em regiões terminais dos cromossomos das três espécies, sem presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS). Dessa forma, a manutenção do 2n (62), nas três espécies, corrobora sua relação filogenética com base em caracteres moleculares, e a diversificação das fórmulas cromossômicas dentro do clado evidencia a presença de rearranjos não-Robertsonianos. O par 1(m) pode ser considerado um marcador citotaxonômico para o clado, pois as três espécies têm um bloco de heterocromatina intersticial, associado com DNAr 5S, par cromossômico que vem sendo considerado homeólogo dentro da família. A sintenia de DNAr 18S e 5S nas espécies *C. absconditus* e *P. denticulata* corroboram sua proximidade filogenética e também o parafiletismo do gênero *Pristobrycon*.

Palavras-chave: piranha, evolução cromossômica, DNA repetitivo, sintenia, apomorfia

Abstract

The Serrasalmini tribe (Bleeker 1859) comprises six genera, with several species popularly known as “piranhas”. It is a diverse group, distributed throughout South America, which presents taxonomic uncertainties, especially in paraphyletic genera, due to their great morphological similarity. Several studies have been carried out to solve and/or understand this problem, through ecological, morphological, molecular or cytogenetic studies. Classical and molecular cytogenetic approaches have already been carried out in some species, representing the various clades of the Serrasalminidae family, but not all. Thus, this study aims to characterize, cytogenetically, a clade that is found in the Serrasalmini tribe and that had no published results, for a better understanding of the chromosomal evolution of the family. Three species, from three genera, were analyzed: *Pristobrycon striolatus*, *Catoprion absconditus* and *Pygopristis denticulata*. All of them have a diploid number (2n) equal to 62 chromosomes, with one and two arms, with species-specific karyotypic formulas and fundamental number. The heterochromatin pattern was evidenced in the centromeric and terminal (bitelomeric) regions in most chromosomes, in addition to a conspicuous interstitial block in the 1(m) pair in the species. The Nucleolus Organizer Regions (Ag-NOR) were multiple and positive for the C band, and their location was confirmed by 18S ribosomal DNA mapping. However, additional 18S rDNA sites were evidenced. The 5S rDNA was located in a chromosomal pair, interstitial in the long arm, corresponding to the 1(m) pair in the three species. Furthermore, we evidenced synteny between 18S and 5S in the species *C. absconditus* and *P. denticulata* which, according to fiber-FISH, are intercalated. Telomeric sequences were detected in terminal regions of the chromosomes of the three species, without the presence of interstitial telomeric sequences (ITS). Thus, the maintenance of 2n (62) in the three species corroborates their phylogenetic relationship, based on molecular characters, and the diversification of chromosomal formulas within the clade shows the presence of non-Robertsonian rearrangements. The 1(m) pair can be considered a cytotaxonomic marker for the clade, as the three species have an interstitial heterochromatin block associated with 5S rDNA, a chromosomal pair that has been considered homeologous within the family. Synteny of 18S and 5S rDNA in *C. absconditus* and *P. denticulata* corroborate their phylogenetic proximity and also the paraphyletism of the genus *Pristobrycon*.

Keywords: piranha, chromosomal evolution, repetitive DNA, synteny, apomorphy

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais sobre serrasalmídeos.....	1
1.1.1 As espécies <i>Catoprion</i> sp., <i>Pristobrycon striolatus</i> e <i>Pygopristis denticulata</i>	4
1.2 Citogenética da Tribo Serrasalmini	6
1.3 DNA repetitivos <i>in tandem</i> e FISH	9
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. Material e Métodos	11
3.1 Material	11
3.2 Métodos	12
3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos	12
3.2.2 Gotejamento e coloração convencional (Giemsa).....	12
3.2.3 Detecção de heterocromatina (banda C)	13
3.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)	13
3.2.5 Extração de DNA	13
3.2.6 Isolamento de sequências repetitivas por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	14
3.2.7 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência - FISH.....	15
3.2.8 <i>Fiber-FISH</i> (FISH em fibras estendidas).....	16
3.2.9 Processamento das imagens	16
4. Resultados	18
5. Discussão	24
6. Conclusão	30
7. Referências bibliográficas	32

Lista de Figuras

- Figura 1.** Espécies de Serrasalmini (piranhas) analisadas no presente estudo: a) *Catoprion absconditus* Mateussi, Melo & Oliveira 2020. Cuvier, 1819. b) *Pygopristis denticulata* (Cuvier 1819). c) *Pristobrycon striolatus* (Steindachner, 1908) Mateussi *et al.* 2020. **Foto:** Claudio Oliveira; M. Sabaj e G. Santos..... 5
- Figura 2.** Filogenia da família Serrasalmidae, com base em caracteres moleculares de Mateussi *et al.* (2020b), adicionado os números diploides (2n) descritos para cada clado, adaptada por Favarato *et al.* 2021..... 7
- Figura 3.** Pontos de coleta dos indivíduos 11
- Figura 4.** Cariótipos convencionalmente corados com Giemsa, banda C e Ag-RON de *C. absconditus* (a, b, c), *P. denticulata* (d, e, f) e *P. striolatus* (g, h, i). Barra: 5µm.....19
- Figura 5.** Mapeamento cromossômico do DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). Barra: 5µm... 21
- Figura 6.** Fiber-FISH com DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) DAPI.....22
- Figura 7.** Representação esquemática dos cromossomos das três espécies, compilando os dados de banda C, Ag-RON, DNAr 18S e 5S. (a) *C. absconditus*, (b) *P. denticulata* e c) *P. striolatus*..... 22
- Figura 8.** Sondas com sequências teloméricas (TTAGGG)_n (vermelho) DAPI (azul)..... 23

Lista de tabelas

Tabela 1. Número de indivíduos, por espécie, analisados no presente trabalho..... 11

Tabela 2. Dados citogenéticos das espécies aqui estudadas. $2n$ = número diploide; NF = número fundamental; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico.18

1. Introdução

Os peixes representam o maior grupo dos vertebrados, com cerca de 41% habitando ambientes de água doce (Nelson *et al.* 2016; Fricke *et al.* 2022) e, destes, a maior diversidade é encontrada na região Neotropical, com estimativas variando de 5.000 a 8.000 espécies, ocorrendo nos grandes sistemas de rios da América do Sul (Menezes *et al.* 2003; Lévêque *et al.* 2008; Queiroz *et al.* 2013; Reis *et al.* 2016).

A bacia Amazônica congrega a maior riqueza ictiológica do planeta em sua área geográfica de cerca de 6.500 km² (Lundberg *et al.* 2010), sendo encontrados representantes das ordens Siluriformes e Characiformes, as mais abundantes (37%), Gymnotiformes, Myliobatiformes, Perciformes, Synbranchiformes (10%) e outras 14 ordens neotropicais (4% cada) (Santos e Ferreira 1999; Agostinho *et al.* 2007; Sleen e Albert 2017).

Entre os Characiformes, a família Serrasalmidae constitui um grupo monofilético, com cerca de 100 espécies válidas, distribuídas em 17 gêneros (incluindo a espécie fóssil *Megapiranha paranensis*) (Ortí *et al.* 1996; Cione *et al.* 2009; Fricke *et al.* 2022). Esta família abriga os peixes conhecidos popularmente como “piranhas” e “pacus”, endêmicos da região Neotropical, onde habitam uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios, lagos, floresta alagada, até ambientes de corredeiras com ampla distribuição e abundância nas bacias Amazônica, do Orinoco e do Paraná-Paraguai (Goulding 1980; Machado-Allison 1983; Jégu 2003).

1.1 Aspectos gerais dos serrasalmídeos

Os serrasalmídeos apresentam características morfológicas que os diferem das demais famílias da ordem Characiformes, são elas: o corpo alto e comprimido lateralmente; a presença de uma série de espinhos abdominais que formam uma quilha ventral; presença de um espinho pré-dorsal anteriormente direcionado, ausente nos gêneros *Collossoma* Eigenmann & Kennedy 1903, *Mylossoma* Eigenmann & Kennedy 1903 e *Piaractus* Eigenmann 1903 (Eigenmann 1915; Géry 1977; Jégu 2003). Ainda dentro dos aspectos morfológicos, o número de séries e tipos de dentes no pré-maxilar têm sido um critério adotado para a classificação da família em grupos (Eigenmann 1915; Ota *et al.* 2013). Sua alimentação é variada e inclui frutos, pequenos invertebrados zooplanctônicos, como insetos, e até tecido carnoso de peixes e outros vertebrados. Estas características são refletidas na morfologia e padrões de sua dentição (Goulding e Carvalho 1982; Machado-Allison e Fink 1996; Jégu 2003). A dentição dos “pacus” é caracterizada por apresentar duas séries de dentes incisiformes ou molariformes, sendo a

interna composta por dois dentes e a externa por cinco, refletindo o hábito alimentar frugívoro. Já, no grupo das piranhas, a dentição é caracterizada por uma série de seis dentes alinhados, triangulares, pontiagudos e cortantes, sendo a piranha-queixo-de-velha (*Catoprion* Müller & Troschel, 1844) uma exceção, uma vez que possui cinco dentes mamiliformes, que se projetam para fora da boca e sua dieta é lepidófaga (alimenta-se de escamas). As piranhas são conhecidas por seu comportamento predatório e agressivo (Jégu 2003; Nelson *et al.* 2016).

Na região Amazônica, a diversidade de pacus e piranhas é muito grande e esse grupo de peixes vem sendo estudado sob diferentes aspectos, entre eles, morfológicos (Jégu 1992; 2003; Mirande 2010; Ota *et al.* 2013; Kolmann *et al.* 2019; Velasco-Hogan e Meyeos 2020), parasitológicos (Thatcher 1991; Acácio *et al.* 2012; Morey *et al.* 2016; Lourenço *et al.* 2017; Gonçalves *et al.* 2018), reprodutivos (Leão *et al.* 1991; Vieira *et al.* 1999; Maciel *et al.* 2011; Andrade *et al.* 2016; Zacardi *et al.* 2019), genéticos (Almeida-Val *et al.* 1992; Teixeira *et al.* 2006; Bignotto *et al.* 2020), moleculares (Ortí *et al.* 1996; Porto 1999; Hubert *et al.* 2007; Freeman *et al.* 2007), citogenéticos (Nakayama *et al.* 2000; 2001; 2002; 2008; 2012; Nirchio *et al.* 2003; Gaviria *et al.* 2005; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019; 2021) e filogenéticos (Thompson *et al.* 2014; Machado *et al.* 2018; Kolmann *et al.* 2020; Mateussi *et al.* 2020a).

A taxonomia e sistemática deste grupo há muito tempo permanecem controversas, ocorrendo discordâncias entre os autores. Eigenmann (1915) classificou o grupo em duas subfamílias dentro da família Characidae. Gosline (1951) e Nelson (1961) consideravam esse grupo como uma subfamília de Characidae, tendo o gênero *Colossoma* como basal. Géry (1972) elevou o grupo à família, mas separou em três subfamílias: (1) Serrasalminae, que inclui as piranhas e pirambebas, com apenas o gênero *Serrasalmus* Lacepède, 1803 e, dentro deste, subgêneros: *Pristobrycon* Eigenmann 1915, *Pygocentrus* Müller & Troschel 1844, *Pygopristsis* Müller & Troschel 1844 e *Taddyela* (*Tometes* Valenciennes 1850); (2) Myleinae incluiu os pacus, com os gêneros: *Myleus* Müller & Troschel 1844, *Mylesinus* Valenciennes 1850, *Colossoma* Eigenmann & Kennedy 1903, *Metynnis* Cope 1878, *Acnodon* Eigenmann 1903, *Mylossoma* Eigenmann & Kennedy 1903 e *Utiaritchthys* Miranda Ribeiro 1937; e (3) Catoprioninae representada por apenas um gênero e uma espécie, *Catoprion mento* (Cuvier 1819). Machado-Allison (1983; 1985) realizou o primeiro trabalho com abordagem cladística para o grupo, com base em caracteres apomórficos, apresentou resultado similar ao de Eigenmann (1915). Assim, classificou este grupo como uma subfamília monofilética dentro de Characidae e incluiu *Catoprion* e *Metynnis* juntamente com as piranhas.

Contudo, estudos filogenéticos, com base em caracteres moleculares (Ortí *et al.* 1996;

Calcagnotto *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2011; Kolmann *et al.* 2020; Mateussi *et al.* 2020a), revelaram que, além de Characidae não ser uma família monofilética, as “piranhas” e “pacus” formam um grupo bem definido dentro da Ordem Characiformes, compondo a família Serrasalminidae, dividida em três grupos e não em dois, como proposto anteriormente por Machado-Alisson 1986. Thompson *et al.* (2014), com base em análises de sequências mitocondriais e nucleares, corroboraram a subdivisão em três grupos: “clado pacu” (*Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*), “clado myleus” (*Acnodon*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Ossubtus* e *Tometes*) e “clado piranha” (*Catoprion*, *Metynnis*, *Pygocentrus*, *Pygopristis*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*), sendo o primeiro tido como basal e o último como mais derivado.

Mateussi *et al.* (2020b) propuseram uma hipótese filogenômica com elementos ultra conservados, na qual foram incluídos todos os gêneros vivos da família, com uma nova classificação intrafamiliar, sendo baseada em características morfológicas previamente descritas na literatura, sendo duas subfamílias: Colossomatinae Kolmann *et al.* 2020 e Serrasalminae Bleeker 1859, esta com duas tribos: Myleini Eigenmann 1903 e Serrasalmini Bleeker 1859. As características morfológicas para cada subfamília envolvem a ausência de um espinho pré-dorsal em Colossomatinae (*Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*) e a presença em Serrasalminae, sendo contínua ao primeiro raio da nadadeira dorsal, na tribo Myleini (*Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Tometes* e *Utiaritchthys*) ou descontínua em Serrasalmini (*Metynnis*, *Catoprion*, *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Serrasalmus* e *Pristobrycon*). Esta classificação foi adotada para este trabalho.

Embora esta divisão esteja bem definida, existem variações inter e intraespecíficas significativas dentro de cada clado, principalmente no que diz respeito à alometria e padrões de coloração, durante seu desenvolvimento ou estágio reprodutivo, assim como a morfologia e distribuição (Nico e Taphom 1988; Jégu 2003; Queiroz *et al.* 2013), características que podem ser ofuscadas pelo parafiletismo (Kolmann *et al.* 2021).

Dentro da tribo Serrasalmini (piranhas), por exemplo, existem incertezas taxonômicas, com divergências na relação entre os gêneros *Pristobrycon* e *Serrasalmus*. Machado-Alisson (1985), em uma análise morfológica, observou a não monofilia de *Pristobrycon*, com espécies mais relacionadas à *Serrasalmus* e apenas *P. striolatus* mais próxima do gênero *Pygopristis*. Ortí *et al.* (1996; 2008) e Thompson *et al.* (2014) encontraram *P. striolatus* mais relacionada com *Catoprion* e *Pygopristis denticulata* e as outras espécies (ex. *Pristobrycon calmoni*) foram agrupadas com *Serrasalmus*. Em vista disso, Kolmann *et al.* (2021) e Mateussi *et al.* (2020b) sugerem a redescritção do gênero *Pristobrycon*, com *P. striolatus* compondo um outro gênero

na família.

Por outro lado, nos últimos anos, vêm sendo realizadas redescrições e descrições de novas espécies, como, por exemplo: *Ossubtus xinguense* (Andrade *et al.* 2016), *Tometes camunani* e *T. siderocarajensis* descritas para a bacia do rio Tocantins-Araguaia (Andrade *et al.* 2013; 2017) e *Myleus pachyodus* descrita para o rio Teles Pires e rio Jamanxim, ambos afluentes do rio Tapajós, nos estados do Mato Grosso e Pará, respectivamente (Andrade *et al.* 2018) e a descoberta de novas linhagens nos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Machado *et al.* 2018; Mateussi *et al.* 2019). O gênero *Catoprion*, que desde a sua descrição em 1819, era considerado monotípico (Fricke *et al.* 2020), teve uma nova espécie descrita: *C. absconditus* Mateussi, Melo & Oliveira, 2020, que ocorre na bacia Amazônica e Essequibo (Mateussi *et al.* 2020a). Ainda, em relação a dados citogenéticos, estes evidenciaram espécies crípticas (Cestari e Galetti Jr. 1992a; Nakayama *et al.* 2001) e polimorfismo (Nakayama *et al.* 2000; Centofante *et al.* 2002), que resultam de uma grande dificuldade no reconhecimento dos limites entre as espécies.

1.1.1 As espécies *Catoprion absconditus*, *Pygopristis denticulata* e *Pristobrycon striolatus*

As espécies de *Catoprion*, *Pygopristis* e *Pristobrycon* compõem uma unidade monofilética e irmã de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Ortí *et al.* 1996; Hubert *et al.* 2007; Thompson *et al.* 2014).

O gênero *Catoprion* Müller & Troschel 1844 (**Figura 1a**), originalmente foi descrita como uma única espécie, *Serrasalmus mento*, conhecida popularmente como piranha-queixuda ou piranha-queixo-de-velha. Está distribuída nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco, Essequibo e alto rio Paraguai. Pode ser facilmente diferenciada dos demais serrasalmídeos por apresentar boca superior com a mandíbula fortemente prognata e apenas cinco dentes mamiliformes no pré-maxilar, que podem projetar-se para fora da boca. Apresenta prolongamento nos primeiros raios das nadadeiras dorsal e anal (Cione *et al.* 2009). Alimenta-se de escamas de outros peixes (predador lepidófago), assim como de insetos e, ocasionalmente, de ovos e até folhas, diferencial alimentar que parece estar relacionado com seu crescimento (Kner 1859; Vieira e Géry 1979).

A época de reprodução ocorre a partir do mês de outubro, sendo observado o comportamento de cuidado parental (Santos 2012). Desde a sua descrição foi considerado monotípico, *C. mento*, entretanto, mais uma espécie foi descrita: *Catoprion absconditus* Mateussi, Melo & Oliveira 2020. Ocorre na bacia Amazônica, incluindo os rios Branco,

Negro, Japurá, Uatumã, Nhamundá, Trombetas, Tapajós e baixo Xingu, e na bacia do Essequibo. É similar à *C. mento* na forma do corpo, padrão de cor, dimorfismo sexual e ecologia, sendo a razão pela qual as duas espécies foram tratadas como coespecíficas por tanto tempo, mas diferem na organização estrutural e número de escamas da linha lateral e análise molecular (Mateussi *et al.* 2020a).

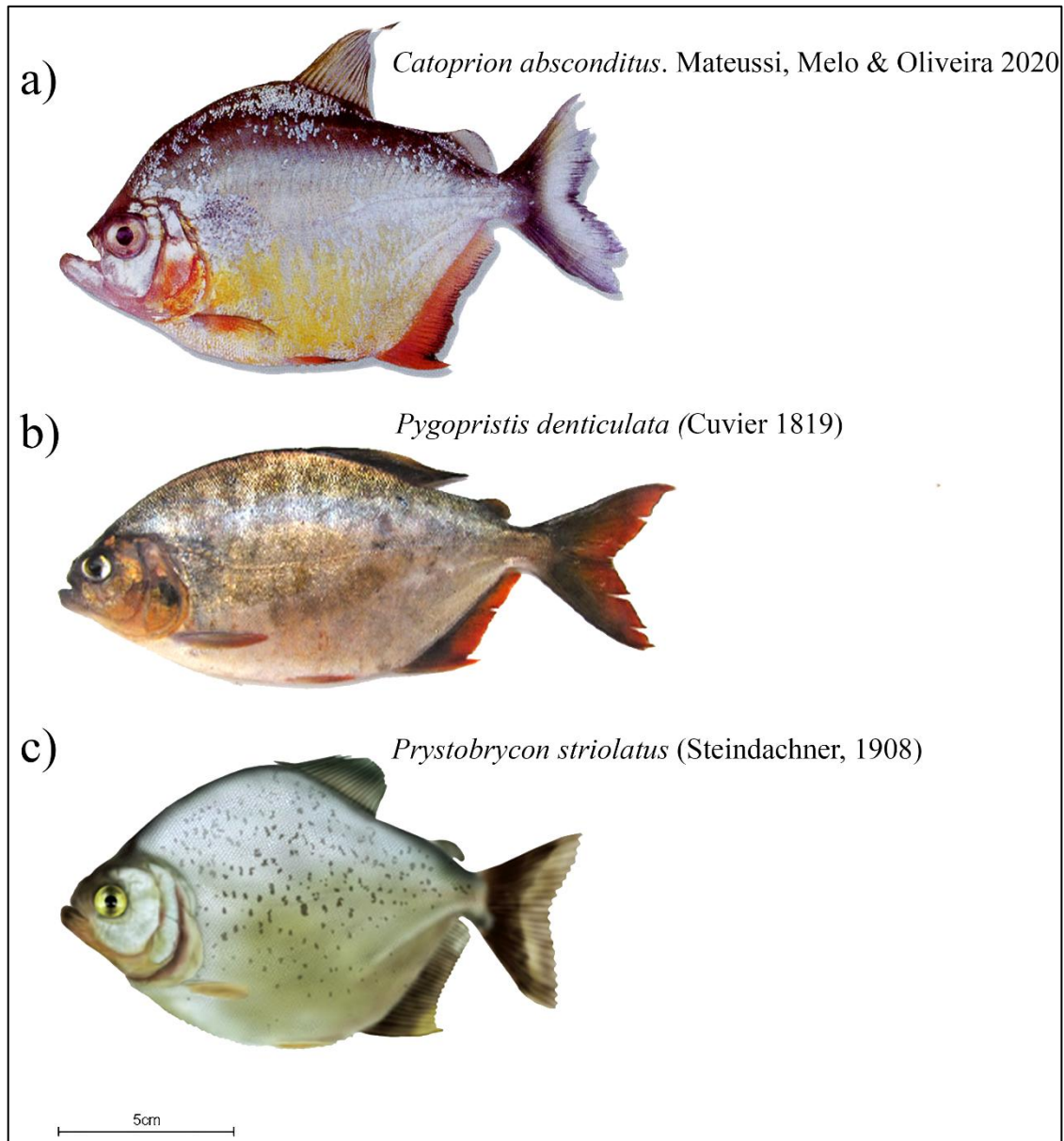


Figura 1. Espécies de Serrasalmini (piranhas) analisadas no presente estudo: a) *Catoprion absconditus* Mateussi, Melo & Oliveira 2020. Cuvier, 1819. b) *Pygopristis denticulata* (Cuvier 1819). c) *Pristobrycon striolatus* (Steindachner, 1908) Mateussi *et al.* 2020. **Foto:** Claudio Oliveira; M. Sabaj e G. Santos.

Pygopristis denticulata (Cuvier, 1819) (**Figura 1b**) é a única espécie representante do gênero, conhecida popularmente como pacu-piranha. Distribuída nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e rios do Escudo das Guianas norte e leste. Boca pequena, dentes quase

simétricos, com um lobo central e dois lobos muito menores de cada lado; seis dentes em cada pré-maxilar, em uma única série, sendo o terceiro dente bem menor que os demais. Podem, eventualmente, alimentar-se de frutos e sementes (Santos *et al.* 2009).

Pristobrycon striolatus (Steindachner, 1908) (**Figura 1c**), conhecida popularmente como piranha-xidaua. Distribuída nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e rios do Escudo das Guianas ao norte e leste. Coloração corporal variável, formada por pequenas manchas ou faixas transversais escuras no flanco dorsal; nadadeiras com extremidades esbranquiçadas; ausência de espinhos na base da nadadeira anal e com ausência de dentes no palato. De hábito alimentar piscívoro, mas, ocasionalmente, consome material vegetal (Santos *et al.* 2009; Nico e Taphom 2016).

1.2 Citogenética da tribo Serrasalmini

A Citogenética é a ciência que estuda os cromossomos. Ela se estruturou pela fusão dos conhecimentos da Citologia com os princípios da Genética, tendo a célula como objeto de investigação e, os mecanismos da herança e da continuidade genética como método (Muniz 2009). Compreende os estudos dos cromossomos quanto à morfologia, organização, função, variação e evolução, fundamental para as comparações intra e interespecíficas (Guerra 1988).

A citogenética de peixes tem realizado estudos, principalmente, através de técnicas convencionais, como Giemsa, banda-C e Ag-RONs, para análise de marcadores citogenéticos clássicos (número diploide e fórmula cariotípica, heterocromatina, região organizadora do nucléolo (RON)) e com a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), para análise principalmente das sequências de DNA repetitivo: DNAs ribossômicos 18S e 5S, telomérico e elementos móveis (Martins *et al.* 2004; Martins *et al.* 2010; Guerra 2012; Guimarães *et al.* 2016; Pinheiro-Figliuolo *et al.* 2019; Souza *et al.* 2021).

Muitas destas informações vêm sendo interpretadas com um enfoque evolutivo, representando uma boa ferramenta, de maneira a auxiliar estudos de sistemática e evolução de diversos grupos de peixes (Bertollo *et al.* 1978; Moreira-Filho e Bertollo 1991; Galetti Jr. 1998).

A citotaxonomia pode ser definida como a identificação de táxons, utilizando técnicas de citogenética, a qual permite individualizar espécies por meio de características cromossômicas, seja de forma isolada ou direcionada ao conjunto cromossômico de uma espécie, abrangendo aspectos morfológicos, funcionais e evolutivos (Guerra 1988).

Em Serrasalminidae, o número diploide varia de $2n=54$ a $2n=64$ cromossomos

(Muramoto *et al.* 1968; Nakayama *et al.* 2001; Moreira-Peres *et al.* 2006; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019; 2021). As espécies da subfamília Colossomatinae apresentam $2n=54$, com apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Almeida-Toledo *et al.* 1987; Nirchio *et al.* 2003; Nakayama *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2014) (**Figura 2**). Tal característica parece ser compartilhada na maioria das espécies das famílias de Characiformes, como Anostomidae (Barros *et al.* 2017; Dulz *et al.* 2019), Curimatidae (Feldberg *et al.* 1992; 1993; Pinheiro *et al.* 2016; Moraes 2021), Cynodontidae (Pinheiro-Figliuolo *et al.* 2020), Parodontidae (Dos Santos *et al.* 2019) e Prochilodontidae (Terencio *et al.* 2016)

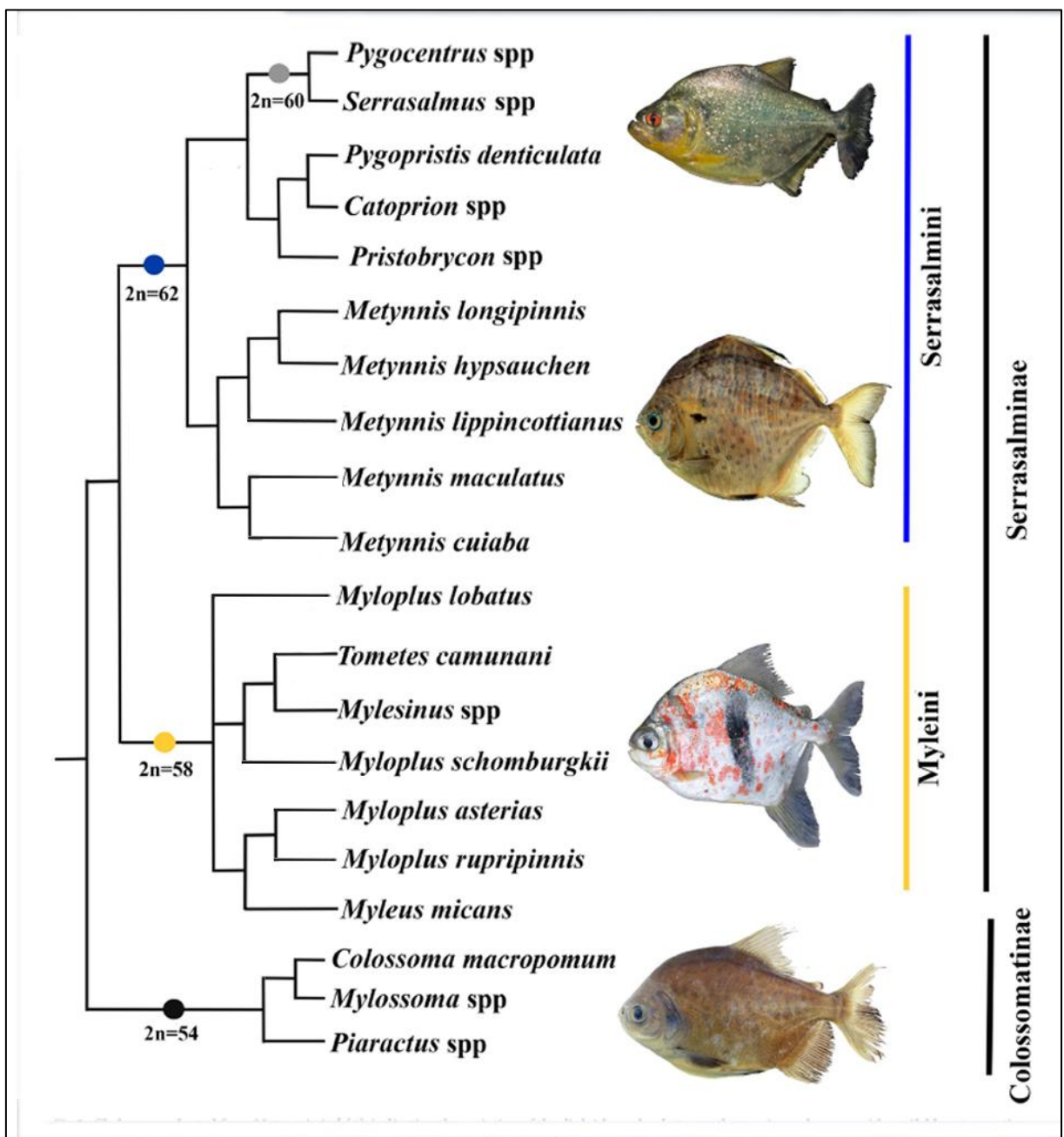


Figura 2. Filogenia da família Serrasalminidae, com base em caracteres moleculares de Mateussi *et al.* (2020b), adicionado os números diploides ($2n$) descritos para cada clado, adaptada por Favarato *et al.* 2020.

Já, a subfamília Serrasalminae apresenta variação no número diploide. Na tribo Myleini, $2n=58$ cromossomos já foi descrito para algumas espécies (Porto 1999; Moreira-Peres *et al.* 2006; Favarato *et al.* 2021) e na tribo Serrasalmini encontramos cromossomos com um e dois braços (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos) e o $2n$ variando de 58 em *Serrasalmus cf rhombeus* (Nakayama *et al.* 2002) a 64 em *S. holandi* (Muramoto *et al.* 1968), com $2n=60$ nas demais espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Cestari e Galetti Jr. 1992a, b; Centofante *et al.* 2002; Nakayama *et al.* 2000; 2008; 2012); e $2n=62$ nas espécies de *Metynnis* (Favarato *et al.* 2019; 2021).

Ainda, cromossomos supranumerários foram evidenciados em fêmeas de *Metynnis lippincottianus* (Favarato *et al.* 2019). Cariomorfos também já foram observados em duas espécies de *Serrasalmus* (*S. spilopleura* e *S. rhombeus*) (Cestari e Galetti Jr. 1992a, b; Nakayama *et al.* 2000; 2001; 2002; Centofante *et al.* 2002), que apresentaram variações no número diploide e fórmula cariotípica, sugerindo a ocorrência de espécies crípticas, o que pode vir a elucidar a distribuição e delimitação dessas espécies, até mesmo em áreas supostamente conhecidas (Jégu 2003). Os dados cromossômicos têm revelado características citotaxonômicas úteis e gerado informações importantes sobre as relações filogenéticas das espécies de piranhas (Nakayama *et al.* 2008).

Em Serrasalmini, as espécies analisadas citogeneticamente são caracterizadas por apresentarem RONS múltiplas, distribuídas em vários cromossomos, geralmente nos braços curtos dos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, podendo chegar até oito pares em *Serrasalmus spilopleura* e *S. rhombeus* (Nakayama *et al.* 2008; 2012).

Quanto á heterocromatina, em serrasalmídeos encontramos blocos biteloméricos, centroméricos, intersticiais e até braços inteiros heterocromáticos, com variações intra e interespecíficas (Porto *et al.* 1992; Nakayama *et al.* 2001; Nirchio *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019; 2021). Ainda, no gênero *Serrasalmus*, todas as espécies apresentam homeologia de um bloco heterocromático intersticial no braço longo de um par, que parece ser marcador do gênero (Nakayama *et al.* 2001; 2008; 2012).

1.3 DNA repetitivo *in tandem* e FISH

Uma outra técnica que vem sendo muito utilizada na citogenética é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que consiste na incorporação de uma sonda, composta por sequências específicas de nucleotídeos marcados com fluorescência, aos cromossomos mitóticos em

análise. Várias sondas são utilizadas e as de uso mais comum em peixes são as sondas de DNA repetitivo (Martins *et al.* 2010; Guerra 2012).

Os eucariotos possuem em seu genoma uma parcela considerável de DNA repetitivo, que pode estar disperso ou *in tandem*. As repetições *in tandem* são constituídas de sequências de DNA não codificantes, repetidas uma após a outra por várias vezes, e incluem os DNAs satélites, mini e microssatélites, regiões teloméricas e DNAs ribossômicos (Martins *et al.* 2004; Martins 2007; Sene *et al.* 2015; Padeken *et al.* 2015).

As família multigênicas de DNAr 45S, que codifica os RNAs ribossômicos, e DNAr 5S tem suas sequências utilizadas como sondas nos estudos de citogenética molecular, permitindo detectar rearranjos e elucidando a evolução cariotípica (Rosa *et al.* 2012; Porto *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2016). O mapeamento físico do DNAr 18S e DNAr 5S nos cromossomos traz importantes informações para a caracterização da diversidade e evolução da ictiofauna neotropical, uma vez que permitem contribuir na elucidação de problemáticas taxonômicas, biogeográficas e filogenéticas (Martins e Galetti Jr.1999; 2000; Martins *et al.* 2000; Ferro *et al.* 2001; Martins *et al.* 2006; Carvalho e Dias 2007; Teixeira *et al.* 2009; Vicari *et al.* 2010). Em Serrasalmini encontramos grande diversidade quanto à distribuição destas sequências, DNAr 5S é, geralmente encontrado em um par, enquanto DNAr 18S é sempre múltiplo (Nakayama *et al.* 2008; 2012; Favarato *et al.* 2019; 2021).

Os dados já citados demonstram que os peixes da família Serrasalminidae apresentam alta variabilidade cariotípica. Entretanto, o clado formado por *Catoprion*, "*Pristobrycon*" e *Pygopristis* ainda carece de análises citogenéticas, pois, embora $2n=62$ já tenha sido sugerido por Nakayama (comunicação pessoal), nenhum dado cromossômico sobre estas espécies é encontrado na literatura.

2. Objetivos

2.1. Geral:

Caracterizar citogeneticamente *Catoprion absconditus*, *Pristobrycon striolatus* e *Pygopristis denticulata*, que formam um clado na tribo Serrasalmini.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar o cariótipo das três espécies por meio da citogenética clássica ($2n$, fórmulas cariotípicas, número fundamental e Ag-RONs e Heterocromatina).
- ✓ Mapear famílias de DNA repetitivo em três espécies de Serrasalmini e inferir sobre sua importância na evolução de um clado da família.
- ✓ Averiguar a existência de possíveis variações intraespecíficas.
- ✓ Inferir sobre os prováveis rearranjos cromossômicos, que ocorreram na carioevolução das três espécies, comparando com dados cromossômicos disponíveis para espécies de outro gêneros, a fim de entender a evolução cromossômica da família.

3. Material e Métodos

3.1 Material

No presente estudo foram analisadas 46 preparações cromossômicas de três espécies de Serrasalmidae: *Catoprion absconditus* (21), *Pygopristis denticulata* (6) e *Pristobrycon striolatus* (19), preparações que estão depositadas no banco de suspensões cromossômicas do Laboratório de Genética Animal – LGA do INPA. Estas suspensões foram obtidas em várias coletas (**Tabela 1, Figura 3**), pela pesquisadora Dra. Celeste Nakayama (*In memoriam*), com recursos de vários projetos no período de 1987 a 2009, sob Licença permanente concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) (Número: 28095-3). Vale ressaltar que todos os exemplares de *Catoprion*, a princípio, foram identificados como *Catoprion mento*. Entretanto, após a descrição da outra espécie de *Catoprion* (*Catoprion absconditus* Mateussi, Melo e Oliveira 2020), com a respectiva distribuição, acreditamos que os indivíduos analisados no presente trabalho tratam-se de *Catoprion absconditus*.

Tabela 1. Número de indivíduos, por espécie, analisados no presente trabalho.

Espécie	Indivíduo		Localidade	Coordenadas	Voucher
	Macho	Fêmea			
<i>Catoprion absconditus</i>	10	11	Rio Uatumã	1° 54' 56,7" S, 59° 28' 25" O	
<i>Pygopristis denticulata</i>	2	4	Rio Demini	1° 44' 45" S, 62° 93' 31" O	
<i>Pristobrycon striolatus</i>	9	10	Anavilhanas	2° 23' 41" S, 60° 55' 14" O	

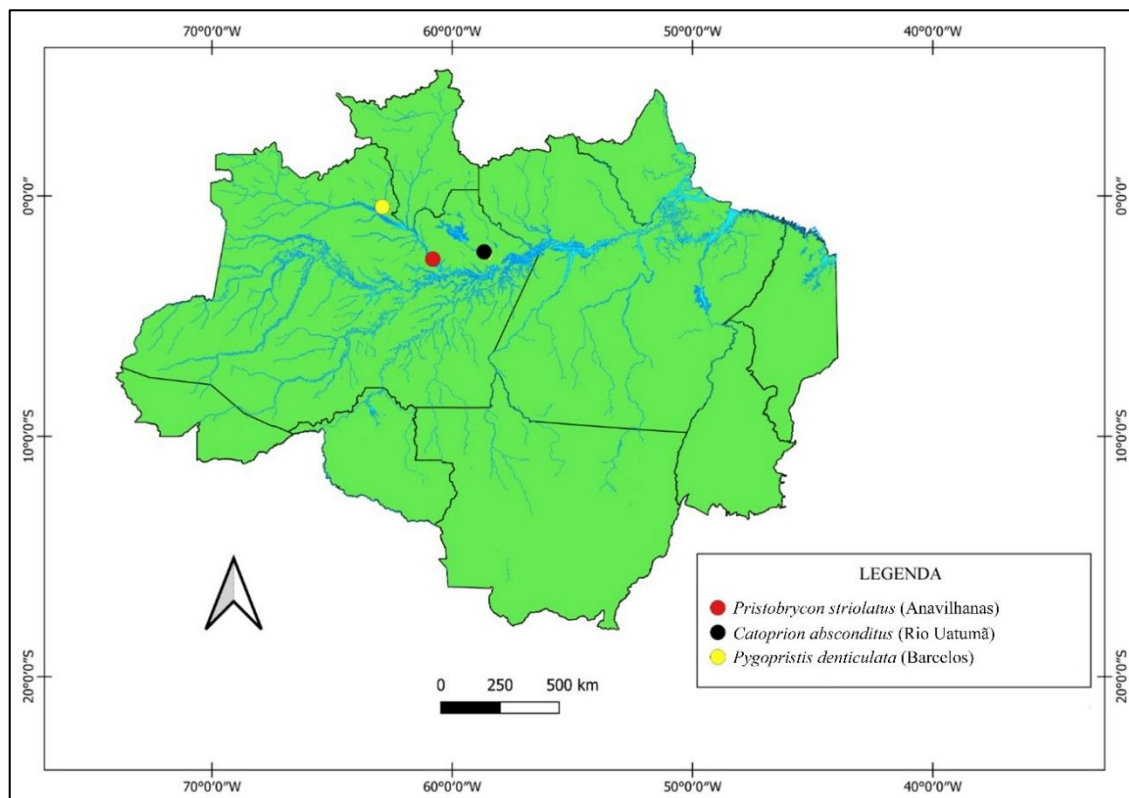


Figura 3. Pontos de coleta dos indivíduos.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir do rim, órgão hematopoiético dos peixes, seguindo a metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978) e com a indução mitótica descrita por Oliveira *et al.* (1986). Com os seguintes passos: o animal recebeu uma injeção intraperitoneal de colchicina 0,0125% e foi mantido em aquário aerado por 50 minutos. Em seguida foi anestesiado até a morte em uma solução de Eugenol 10%, para a coleta de uma porção do rim e uma porção do músculo para extração de DNA. O material foi transferido para uma cubeta de vidro, contendo 15 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M, onde foi divulsionado com auxílio de pinças e seringa hipodérmica desprovida de agulha, com movimentos leves de aspiração e expiração, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células. Esta suspensão foi incubada em uma estufa a 37 °C por cerca de 25 minutos. Em seguida o material foi transferido para um tubo de centrífuga e adicionou-se 1 mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) e o material foi ressuspensionado e centrifugado por 10 minutos à 900 rotações por minuto (RPM). O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspender o material e acrescentando cerca de 10 mL de fixador. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm, retirando o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur. Repetiu-se o passo mais 2 vezes. Após isso, foi eliminado o sobrenadante da última centrifugação e adicionado cerca de 1,5 mL de fixador no material, transferindo-o para tubos plásticos do tipo eppendorf, os quais foram armazenados em freezer à -20 °C no banco de suspensões cromossômicas do Laboratório de Genética Animal do INPA. Portanto, o presente trabalho iniciou as análises a partir deste ponto. De onde seguiu para gotjamento das preparações em lâminas esterilizadas.

3.2.2. Gotejamento e coloração convencional (Giemsa)

Para a preparação das lâminas, as mesmas foram colocadas em solução sulfocrômica por 24 horas. Após este período, foram retiradas, lavadas em água destilada e corrente e armazenadas em álcool 100%.

Para a descrição do cariótipo das espécies analisadas, as lâminas foram imersas a 60 °C em banho-maria e em seguida a suspensão celular foi gotejada sobre a lâmina. Estas foram secas no ambiente e, posteriormente, coradas com Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato, pH 6,8 por 10 minutos, lavadas e secas ao ar, sendo observadas ao microscópio óptico.

3.2.3. Detecção da Heterocromatina (Banda C)

Para a detecção da heterocromatina utilizamos a técnica de bandeamento C descrita por Sumner (1972), com modificações. As lâminas, já contendo as preparações cromossômicas, foram tratadas durante 10 minutos com ácido clorídrico (HCl 0,2N) à temperatura ambiente, lavadas rapidamente em água destilada e secas ao ar. Em seguida foram incubadas à 42 °C em solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a 5% por cerca de 1 minuto e 40 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida, imergindo as lâminas rapidamente em solução de HCl 0,2N (em temperatura ambiente) e, após, lavadas em água destilada. Em seguida, foram secas novamente ao ar e incubadas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria à 60 °C, por um período de 30 minutos, sendo novamente lavadas em água destilada e secas ao ar.

Posteriormente, as lâminas foram coradas de acordo com Lui *et al.* (2012), utilizando uma solução contendo 0,5 µL de iodeto de propídio em 20 µL de *antifading* Vectashield®, coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro por 20 minutos. Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

3.2.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON) foi utilizada a técnica de precipitação de cristais de Prata (Ag-RON), descrita por Howell e Black (1980), com modificações. A técnica consistiu em pingar sobre a lâmina com a preparação cromossômica duas gotas de uma solução coloidal de gelatina (obtida com 1g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 50 mL de água destilada e acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico). Em seguida, adicionou-se sobre cada gota desta solução, duas gotas de solução aquosa de AgNO_3 (Nitrato de Prata) a 50%. A lâmina foi levemente agitada e coberta com lamínula e incubada em câmara úmida e levada à estufa a 60 °C por um período de 5 a 7 minutos, até atingirem uma coloração dourada ou marrom escura. Em seguida foi lavada em água destilada de forma a permitir que a lamínula fosse retirada com o próprio jato de água. As lâminas secaram diretamente ao ar.

3.2.5 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi feita a partir do tecido muscular e fígado das espécies em estudo, preservado em etanol 100%, utilizando o Kit de extração Wizard® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foi adicionado o tecido, juntamente com 310 μL de solução de EDTA + *Nuclei Lysis Solution* (60 μL de EDTA 0,5M + 250 μL de *Nuclei Lysis Solution*) e 8 μL de proteinase *K*. Esta mistura foi incubada por, aproximadamente, 3 horas à 55 °C, para dissociar o tecido. Foi adicionado RNase à mistura por 30 minutos à 37 °C. Após, foi mantido em freezer por 5 minutos e então centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm, o sobrenadante foi transferido para tubos novos e adicionado 300 μL de isopropanol gelado, centrifugando-os por 10 minutos à 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 300 μL de álcool 70% gelado foram adicionados e centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm. O álcool 70% foi descartado e 300 μL de álcool 100% adicionado e centrifugado por 10 minutos à 13000 rpm. O álcool foi descartado e os tubos mantidos à 37 °C para secagem. Foram adicionados 50 μL de DNA *Rehydration Solution* e deixado *overnight*. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese com gel de agarose a 1% (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 60 minutos), corado com GelRed Acid Gel Stain Biotium (1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram observadas no transluminador de luz ultravioleta (Loccos Biotechnology) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

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

As sequências repetitivas, utilizadas como sonda, foram isoladas por PCR. O isolamento dos genes ribossomais 18S e 5S foi realizado, utilizando os seguintes *primers*: 18S: 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e 18Sr (5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010) e 5Sf (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC3') e 5Sr (5'- CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC 3') (Martins e Galetti Jr.1999). A amplificação enzimática destes elementos, dos indivíduos amostrados, foi realizada a partir do DNA celular total previamente isolado, sendo a amplificação realizada através da técnica de PCR. Os produtos de PCR fita dupla foram obtidos em um volume total de 25 μL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidade de Taq DNA Polimerase; 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume). As reações foram processadas em termociclador (*Eppendorf - Mastercycler Gradient*). O programa de PCR foi utilizado, seguindo as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 minuto a 95 °C (para desnaturação da fita de DNA); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). DNAr 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72

°C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). Depois de amplificado, os produtos de PCR foram verificados e quantificados em gel de agarose 1% e quantificados em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). Foram usados para as sondas teloméricas, os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅, com os parâmetros de marcação: 1µL do *primer F*, 1µL do *primer R*, 12,5µL de Go Taq e 9,5µL de água destilada com um volume final de 24µL.

3.3.7 Hibridização *in situ* fluorescente - FISH

Os produtos de PCR (DNA ribossomal 18S e sequências teloméricas) foram marcados seguindo o método de *Atto nick translation Kit* (Jena Bioscience), 550 – vermelho e 488 – verde, para o DNA ribossomal 5S, seguindo as instruções do fabricante.

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) adotada foi a descrita por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações.

Tratamento das lâminas:

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente no “termoshaker”, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica gelada 70, 85 e 100%, 5 minutos cada e secas ao ar. As lâminas foram incubadas em 90 µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 °C por 1h em câmara úmida. Transcorrido este tempo, as lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada e em PBS 1x por 5 minutos.

Fixação:

As lâminas então foram fixadas em uma solução de formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavadas em PBS 1x por 5 minutos, sendo então desidratadas em série alcoólica gelada (70, 85, 100%) por 5 minutos cada. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 3 minutos e em seguida desidratado em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada, secando ao ar.

Solução de hibridização:

Simultaneamente à desidratação da lâmina em série alcoólica, a solução de hibridização contendo formamida 100% (concentração final 50%), sulfato de dextrano 50%, 20xSSC (concentração final de 2xSSC), sondas marcadas e água milli-Q foi preparada e posteriormente desnaturada a 95 °C por um período de 10 minutos, sendo passada imediatamente ao gelo.

Hibridação:

Foi então colocado 50 µL da solução de hibridação sobre a lâmina com os cromossomos desnaturados e incubada em câmara úmida (H₂O destilada) a 37 °C por aproximadamente 18 horas (*overnight*).

Lavagens:

Após o tempo de hibridização, as lâminas foram lavadas em formamida 15% a 42 °C durante 10 minutos e posteriormente lavadas em solução Tween 0,5%, por 5 minutos.

Montagem das lâminas:

As lâminas foram montadas com 20 µL de *antifading* (Vectashield®) mais 1 µL de DAPI (0,2 mg/mL), coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro. Após a preparação, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

3.3.8 *Fiber-FISH* (FISH em fibras estendidas)

A técnica de *Fiber-FISH* foi realizada segundo Barros *et al.* (2011). As lâminas com a suspensão celular, foram lavadas com tampão salino fosfatado (PBS1x) por dois minutos a temperatura ambiente e em seguida foi realizada desidratação em série alcóolica 70%, 85% e 100% por dois minutos cada e secas. As mesmas foram colocadas em posição horizontal e na sequência foi adicionada uma solução de 400 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M diluída em álcool 30% em um dos cantos da lâmina. Posteriormente foi realizado um esfregaço contínuo sobre a preparação a partir do topo para baixo com o auxílio de outra lâmina, de tal forma a cobrir toda a superfície, para que ocorresse o alongamento das fibras dos núcleos interfásicos. Em seguida 500µL de etanol 100% foi imediatamente aplicado na lâmina que foi mantida inclinada até completa evaporação. Seguiu-se para a FISH. Conforme descrito no item anterior.

3.3.9 Processamento das imagens

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio óptico foi estabelecido o número diploide modal e suas frequências relativas para cada indivíduo. As lâminas submetidas à coloração convencional (Giemsa) e Ag-RON foram analisadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão, num aumento de 1.000 vezes. As lâminas que utilizaram fluorocromos (Bandeamento C e FISH) foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus Bx-51, sob filtro apropriado. Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas, sendo que as melhores tiveram sua imagem capturada, utilizando sistema de captura de imagens DPController e processadas pelo programa DPManager.

Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS6, onde os cromossomos metafásicos mitóticos foram recortados, emparelhados, medidos no programa DPManager e colocados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia e classificação dos cromossomos foi determinada de acordo com a posição do centrômero segundo Levan *et al.* (1964), com base no índice de relação de braços (RB= comprimento do braço maior/comprimento do braço menor), podendo ser metacêntricos (RB= 1,0-1,7), submetacêntricos (RB= 1,71-3,0), subtelocêntricos (RB= 3,01-7,0) e acrocêntricos (RB > 7,00). Na determinação do número de braços (NF) foram considerados os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) como tendo dois braços e os acrocêntricos (a) como tendo apenas um braço.

4. Resultados

Foram analisadas cerca de 30 metáfases por indivíduo, e as três espécies apresentaram o número diploide (2n) igual a 62 cromossomos, com o cariótipo constituído por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Contudo, diferem na Fórmula Cariotípica (FC) e Número Fundamental (NF) (**Tabela 2, Figura 4 a, d, g**). Não foi evidenciado heteromorfismo cromossômico sexual, comparando os cariótipos entre machos e fêmeas.

Tabela 2 - Dados citogenéticos das espécies aqui estudadas. 2n= número diploide; NF= número fundamental; m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; st= subtelocêntrico; a= acrocêntrico.

Espécie	2N	NF	Fórmula Cariotípica
<i>Catoprion absconditus</i>	62	118	24m+28sm+4st+6a
<i>Pygopristis denticulata</i>	62	114	22m+26sm+4st+10a
<i>Pristobrycon striolatus</i>	62	112	22m+22sm+6st+12a

A heterocromatina das três espécies está localizada, preferencialmente, nas regiões centroméricas e terminais (biteloméricas) dos cromossomos. Entretanto, alguns blocos são espécie-específicos, sobretudo aqueles intersticiais (**Figura 4 b, e, h; Tabela 3**).

Em *Catoprion absconditus* foram evidenciadas marcações heterocromáticas intersticiais no braço longo dos pares 1, 4, 5 e no braço curto do par 13 (m), 19 (sm) e apenas centromérica nos pares 10, 11 e 12 (m) e 21 (sm) (**Figura 4b**).

Em *Pygopristis denticulata* foram evidenciadas marcações intersticiais no braço longo dos pares 1 (m), 13 e 20 (sm). E apenas centromérica nos pares 4, 9 e 11 (m). Os pares 7 e 8 (m) evidenciaram marcações apenas biteloméricas e com apenas uma marcação telomérica e centromérica nos pares 6 (m) e 20 (sm) (**Figura 4e**).

Pristobrycon striolatus, por sua vez, blocos intersticiais apareceram apenas no par 1 (m), sendo que o 22 (sm) evidenciou marcação apenas centromérica e o par 27, apresentou marcação centromérica e terminal no braço longo, enquanto os demais pares possuem marcação terminal, às vezes bitelomérica (**Figura 4h**). Homeologias de blocos C⁺ foram encontradas entre as três espécies (**Figura 6**).

As regiões organizadoras de nucléolo ativas na última intérfase, detectadas, indiretamente, pela técnica de impregnação por nitrato de prata (Ag-RON), foram evidenciadas em 3 a 4 pares cromossômicos, sendo, portanto, múltiplas. Ainda, todas as RONS foram positivas para banda C e localizadas nas porções terminais dos cromossomos.

Catoprion absconditus mostrou a maior diversidade em número e localização, evidenciando 8 sítios, sendo terminal nos braços curtos do par 26 (sm), terminal nos braços longos dos pares 27 e 28 (st) e 29 (a) (**Figura 4c**).

Pygopristis denticulata evidenciou 6 sítios, sendo terminal nos braços longos do par 25 (st), terminal nos braços curtos do par 26 (st) e nos braços curtos do par 27 (a) (**Figura 4f**).

Pristobrycon striolatus, embora também tenha evidenciado 6 sítios de RONS, estes foram localizados apenas em acrocêntricos, sendo em posição terminal dos braços curtos dos pares 26, 27 e 28 (**Figura 4i**).

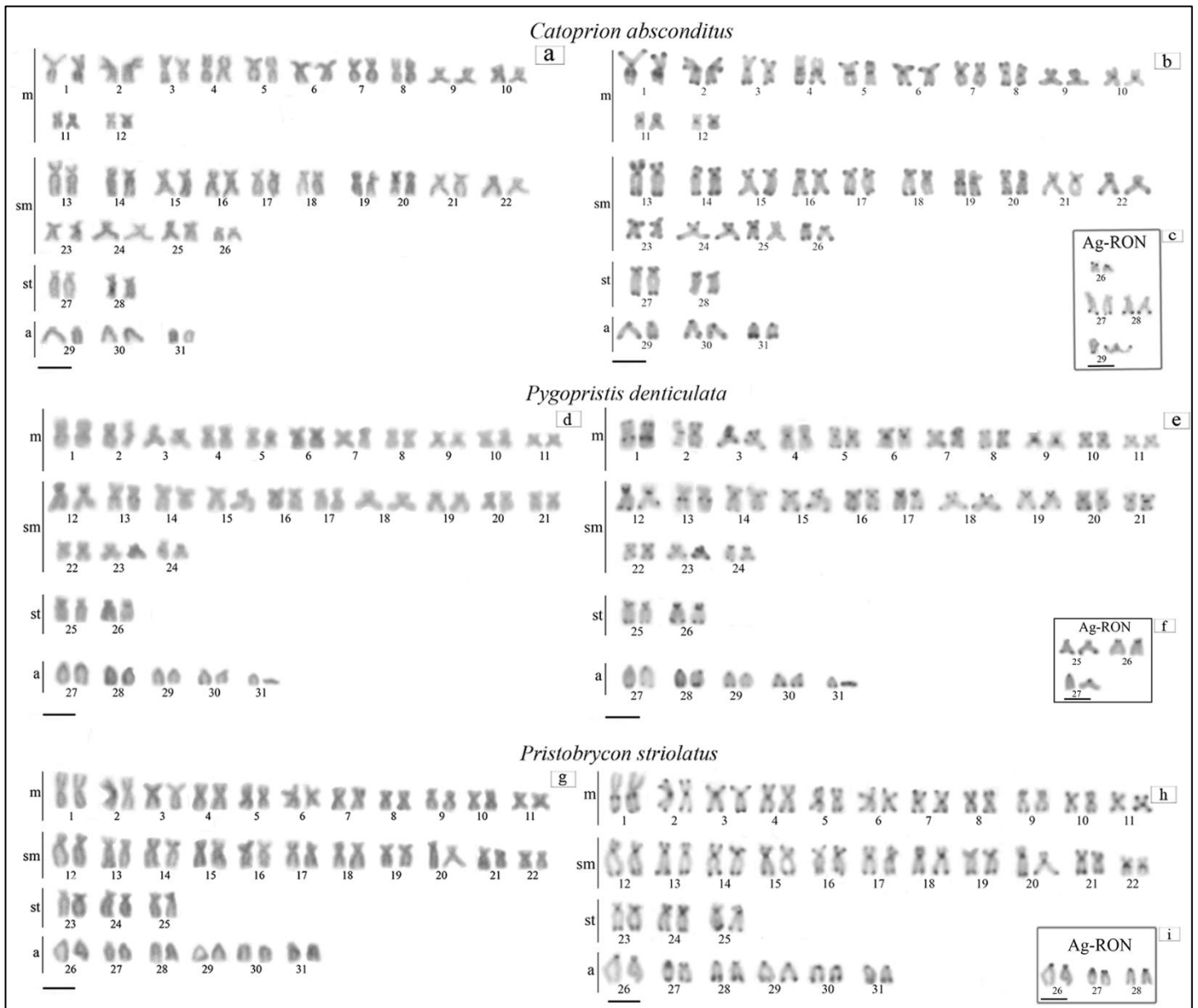


Figura 4 - Cariótipos convencionalmente corados com Giemsa, banda C e Ag-RON de *C. absconditus* (a, b, c), *P. denticulata* (d, e, f) e *P. striolatus* (g, h, i). Barra: 5µm

Com a Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), o mapeamento do DNA ribossomal 18S confirmou a localização das regiões organizadoras de nucléolo ativas nas três espécies analisadas. Entretanto, sítios adicionais foram evidenciados:

Nas espécies *C. absconditus* (Ag-RONs nos pares 26, 27, 28, 29) e *P. denticulata* (Ag-RONs nos pares 25, 26, 27) foi evidenciada uma marcação adicional em posição intersticial no par 1 (m), colocalizada com o bloco de heterocromatina (C⁺) e em sintenia com DNAr 5S (**Figura 5, c, d**).

Para *P. striolatus*, por outro lado, evidenciou 14 sítios em cromossomos acrocêntricos, sendo seis coincidentes com as Ag-RONs (pares 26, 27, 28) e marcações terminais adicionais nos pares 26q, 29q, 30p e 31p.

O mapeamento do DNAr 5S evidenciou apenas um par marcado em todas as espécies, com o sítio ocorrendo em posição intersticial, no par 1 (m), e estando colocalizado com um bloco de heterocromatina (Tabela 3; Figura 5).

Através da dupla-FISH e sobreposição de imagens, foi observada sintenia entre os genes DNAr 18S e 5S, os quais estão colocalizados no par cromossômico 1m de *C. absconditus* e *P. denticulata*, sendo coincidente com um bloco heterocromático (box da **Figura 5**). Por meio da técnica de *Fiber-FISH*, as fibras estendidas mostraram que os genes ribossomais colocalizados estão adjacentes com quantidades variáveis das classes de DNA ribossomal nas duas espécies analisadas (**Figura 6**)

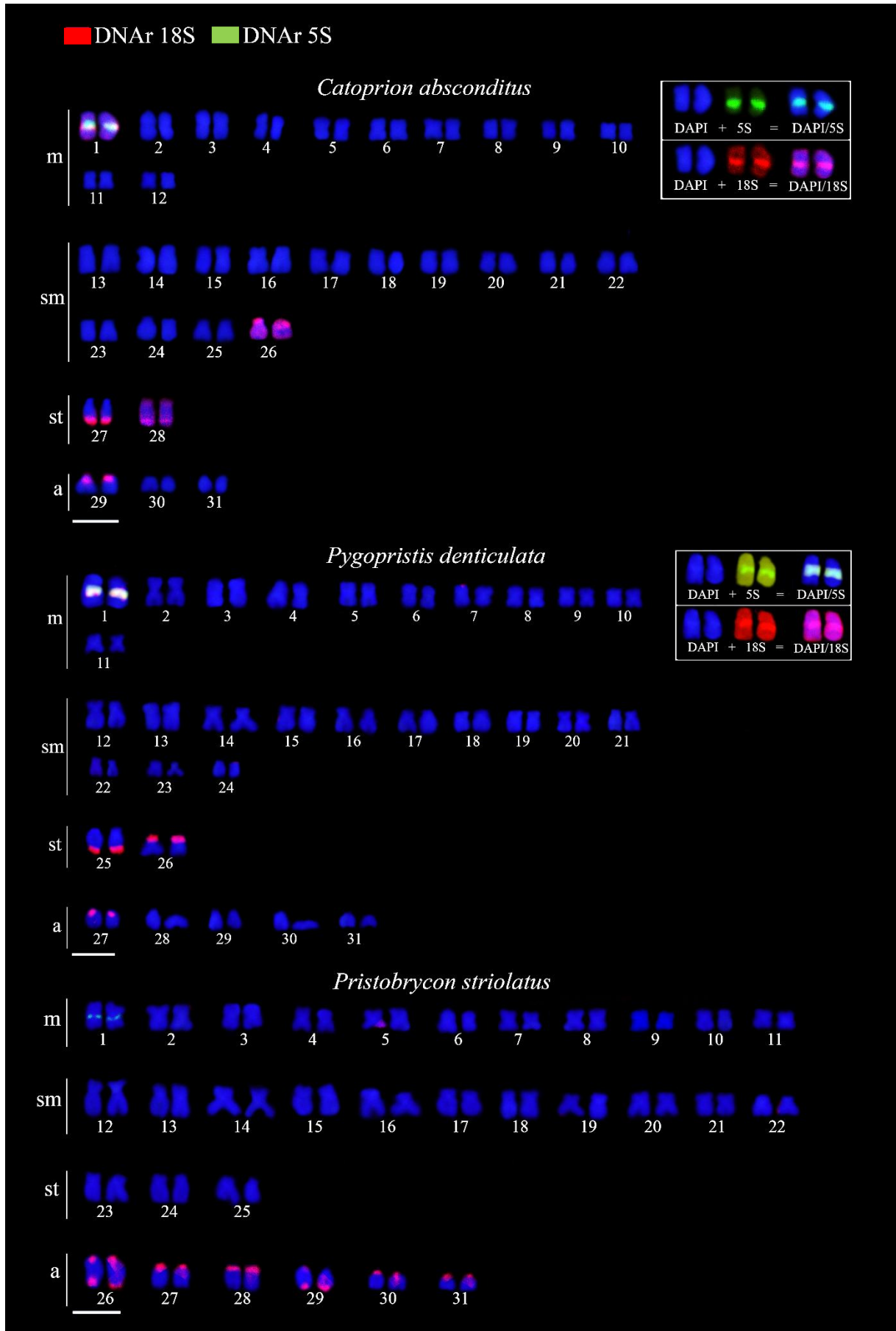


Figura 5 - Mapeamento cromossômico do DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde). Barra: 5µm

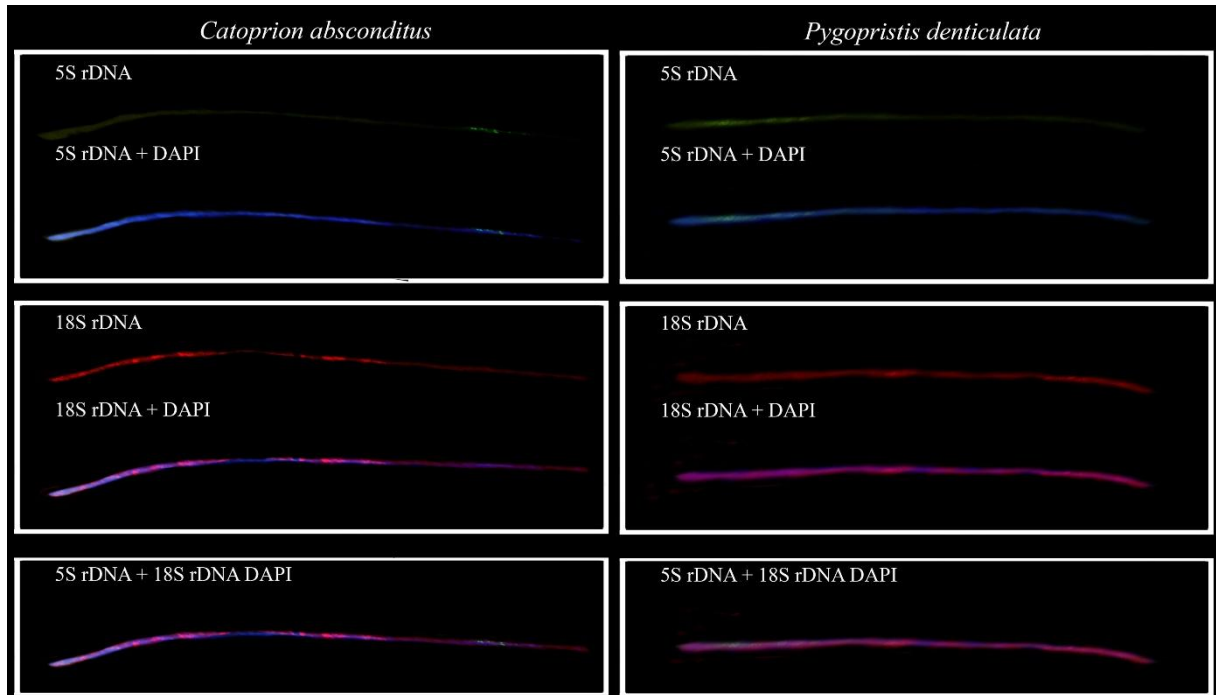


Figura 6 – Fiber-FISH com DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) DAPI (azul).

Na figura 7 nós destacamos as características citogenéticas entre as três espécies, como o bloco de heterocromatina intersticial do par 1 (m) e a localização do DNAr 5S (par 1). Entre *C. absconditus* e *P. denticulata* temos ainda a sintenia do bloco heterocromático com DNAr 18S e 5S, mas não com Ag-RON.

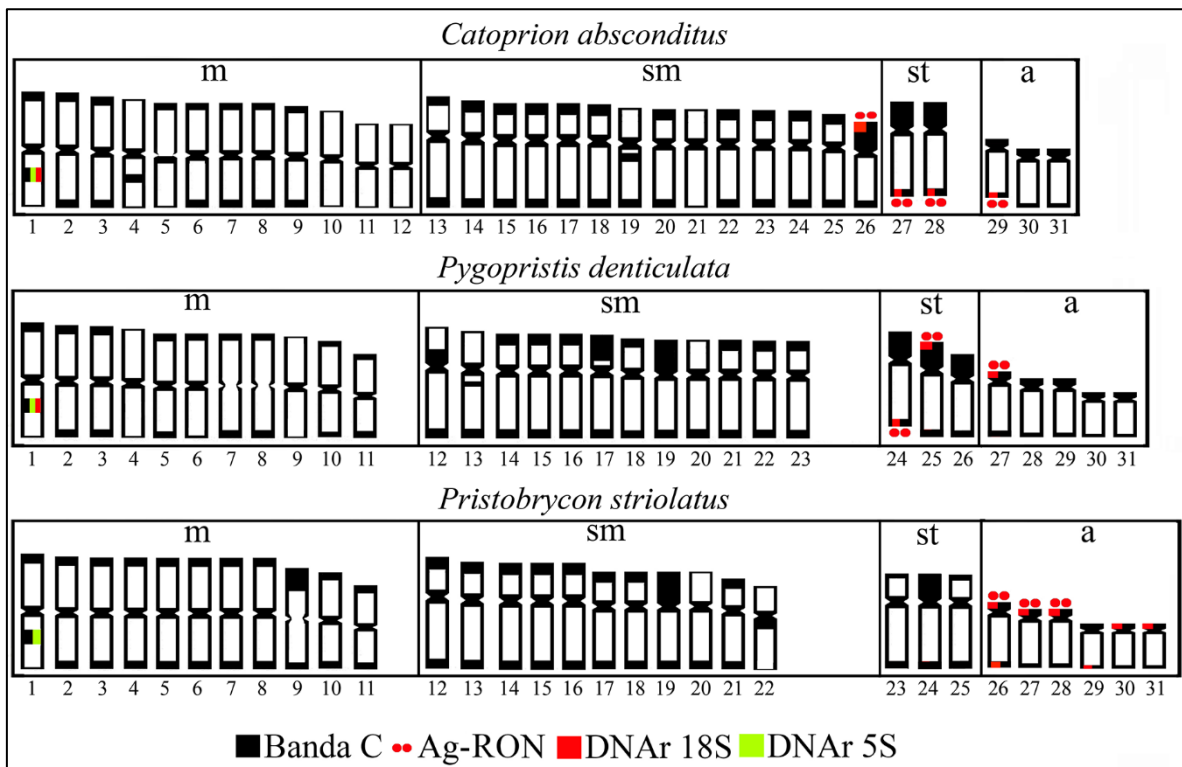


Figura 7 – Representação esquemática dos cromossomos das três espécies, compilando os dados de banda C, Ag-RON, DNAr 18S e 5S.

Sequências teloméricas (TTAGGG)_n foram evidenciadas nas porções terminais de todos os cromossomos das três espécies (**Figura 8**) e não foi evidenciada a presença de Sequências Teloméricas Intersticiais (ITS).

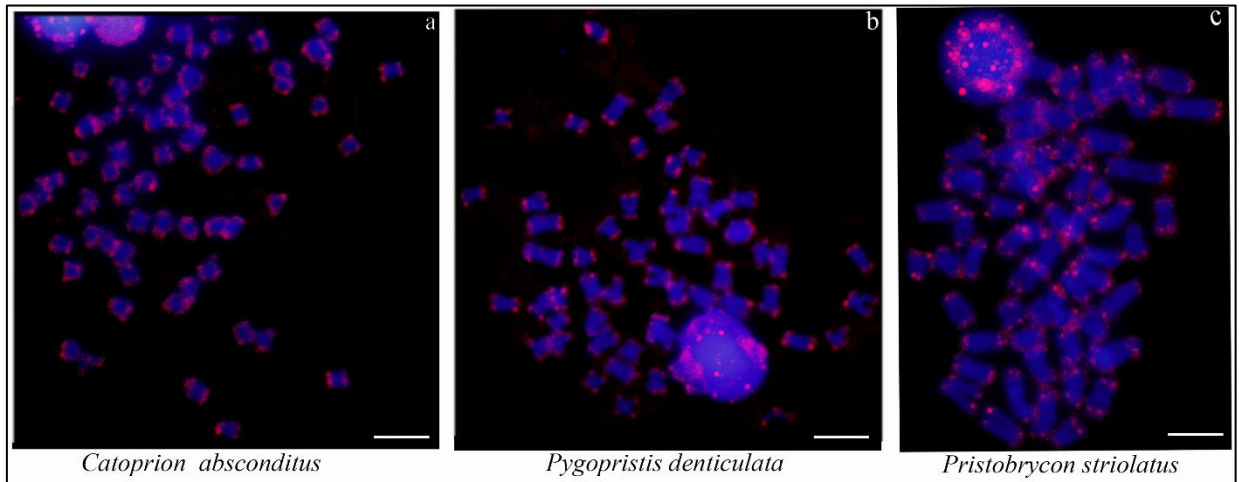


Figura 8 - Sondas com sequências teloméricas (TTAGGG)_n (vermelho) DAPI (azul). Barra: 5µm.

5. Discussão

O número diploide na família Serrasalmidae varia de 54 a 64, entretanto, dentro de cada clado, o $2n$ parece ser conservado (Favarato *et al.* 2021), exceto *Serrasalmus* que tem duas espécies com número diploide diferente de 60 cromossomos, *S. cf. rhombeus* e *S. hollandi*, 58 e 64 (Muramoto *et al.* 1968; Nakayama *et al.* 2002), respectivamente. Estas duas exceções são descritas como eventos independentes, não tendo nenhuma relação filogenética (Favarato *et al.* 2021). A subfamília Colossomatinae, menos derivada dentro da família, tem todas as espécies com $2n=54$ cromossomos com dois braços, sendo este número diploide (54) considerado ancestral para a família, uma vez que, grupos-irmão a ela (Prochilodontidae, Anostomidae, Parodontidae) (Melo *et al.* 2022) apresentam $2n=54$ cromossomos. Assim, o ancestral comum de Serrasalmidae vem de uma linhagem com 54 cromossomos e com tendência ao aumento deste número e presença de cromossomos de um braço (Favarato *et al.* 2021). Tendência que pode ter ocorrido por rearranjos do tipo fissão cêntrica (Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2021). Interessante notar a diferença do número diploide entre as duas tribos de Serrasalmidae, onde Myleini tem $2n=58$ e Serrasalmini já tem dois números diploides (60 e 62).

No clado aqui analisado, *C. absconditus*, *P. denticulata* e *P. striolatus* apresentam $2n=62$ cromossomos, diferindo nas fórmulas cariotípicas (FC), principalmente pelo número de cromossomos st-a. Este $2n$ é compartilhado com espécies do gênero *Metynnis*, que têm espécie com um ou dois pares de cromossomos de um braço (ex. *M. longipinnis*), enquanto outras apresentam apenas cromossomos com dois braços (ex. *M. maculatus*) (Favarato *et al.* 2019; 2021).. Essa variação nas fórmulas cariotípicas de espécies próximas, com mesmo número diploide, evidencia de forma clara a presença de muitos rearranjos não-Robertsonianos como inversões, translocações, reposicionamento do centrômero e duplicações de regiões heterocromáticas, pois temos vários cromossomos que têm o braço curto totalmente heterocromático (**Figura 7**).

Ainda, é curioso notar que o parafiletismo de *Pristobrycon*, suportado por dados morfológicos e moleculares (Machado-Alisson 1985; Kolmann *et al.* 2020; Mateussi *et al.* 2020b), é também refletido por dados citogenéticos. *P. striolatus* compartilha o número diploide com *Catoprion* e *Pygopristis*, e com o único pacu da tribo, *Metynnis*, rementendo ao caráter ancestral da tribo, enquanto *Pristobrycon calmoni* (espécie tipo do gênero) compartilha o $2n$ com as “piranhas verdadeiras”, como *Serrasalmus* ($2n=60$) (Nakayama *et al.* 2008), que é um caráter mais derivado na tribo.

Em relação ao padrão heterocromático, nas três espécies aqui estudadas, a heterocromatina localizou-se, preferencialmente, nas regiões centroméricas e terminais (biteloméricas) na maioria dos cromossomos. Alguns cromossomos apresentaram braços curtos inteiramente heterocromáticos, além de blocos intersticiais espécie-específicos. A heterocromatina (C⁺) também esteve associada com as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) e sítios de DNA ribossomal 18S e 5S. Este parece ser um padrão comum para a família e mesmo que algumas espécies apresentem variações para este marcador, não se observa grandes diferenças dentro dos clados. Em Collossomatinae, por exemplo, a maioria das espécies analisadas possuem heterocromatina centromérica. Já, em Serrasalminae, além de centromérica, as espécies apresentam também cromossomos com blocos terminais, às vezes biteloméricos (Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2021). É possível notar um aumento de blocos heterocromáticos, quando se compara espécies de todos os clados, desde o clado menos derivado (2n=54) até os mais derivados (2n=60 e 62).

É possível que este padrão esteja relacionado com os rearranjos Robertsonianos, os quais promoveram mudanças no número diploide, e os não-Robertsonianos, que modificaram as fórmulas cariotípicas. Como já sabido, blocos heterocromáticos são considerados pontos suscetíveis a quebras cromossômicas, por estarem relacionados a DNAs repetitivos, facilitando assim rearranjos cromossômicos (Pinheiro *et al.* 2016).

Vários estudos vêm mostrando que o centrômero, região rica em heterocromatina, é uma região cromossômica dinâmica e pode ser reposicionada em resposta epigenômica, promovendo, assim, a modificação da FC, sem reposicionamento gênico (Rocchi *et al.* 2012). Em relação aos cromossomos com braços curtos heterocromáticos deve ter sido por duplicação *in tandem*, sobretudo em associação com elementos repetitivos de DNA, uma vez que a natureza repetitiva desses elementos parece ser o gatilho e o alvo para a heterocromatinização (Guimarães *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2016). A presença de braços curtos totalmente heterocromáticos em submetacêntricos e subtelocêntricos também foi encontrada em outros representantes da família, como em espécies de *Serrasalmus* (Nakyama *et al.* 2002) e *Myloplus* (Favarato *et al.* 2021).

Um fato bastante interessante nos serrasalmíneos é a presença de um bloco heterocromático conspicuo que ocorre em posição intersticial nos braços longos de um par, que no gênero *Serrasalmus* é o par 7(m) e foi considerado marcador do gênero, pois todas as espécies até agora analisadas o apresentam (Cestari e Galetti Jr 1992b; Nakayama *et al.* 2001;

Centofante *et al.* 2002); em espécies de *Pygocentrus*, este bloco está no par 3(m) (Nakayama *et al.* 2008, 2012) e este bloco é colocalizado com o sítio de DNAr 5S.

No presente trabalho, um bloco de HC conspícuo, intersticial nos braços longos também foi observado no par 1(m) das três espécies e também colocalizado com o sítio de DNAr 5S. Acreditamos que este par cromossômico, por apresentar esta marcação compartilhada, seja homeólogo entre as espécies da tribo Serrasalmini, sendo que inúmeros rearranjos teriam colocado este par em diferentes posições no cariótipo. Assim, é possível notar que rearranjos não-robertsonianos estão envolvidos e desempenham importante papel na diversificação do padrão de heterocromatina, nas diferentes espécies de Serrasalminae.

Vários estudos sugerem que as sequências de DNA repetitivo, separadas por um espaçador variável não transcrito (NTS), que apresenta extenso comprimento e variação de sequência, podem dar um dinamismo acentuado, sobretudo aos genes de DNAr 5S (Martins *et al.* 2002; 2013; de Freitas Mourão *et al.* 2017). Além disso, as sequências intergênicas heterocromáticas são relacionadas à proteção das sequências gênicas às pressões seletivas a que estariam expostas, permitindo assim a evolução diferencial das regiões genômicas (Grewal e Jia 2007; Gross *et al.* 2009; 2010; Nakayama *et al.* 2012; Favarato *et al.* 2019; 2021).

A presença de rearranjos cromossômicos na evolução do clado em estudo é verificada também pela localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RON e DNAr 18S), que apresenta ampla variação interespecífica. Em *P. striolatus*, que tem 6 pares acrocêntricos, a Ag-RON está presente em 3 deles e o DNAr 18S confirmou estes sítios, porém foram detetados mais 8 sítios de DNAr 18S, sendo um par bitelomérico, totalizando 14 sítios. Em *P. denticulata*, a Ag-RON está presente em apenas um par acrocêntrico, e as demais em subtelo-cêntricos, com o DNAr 18S confirmando os 6 sítios de Ag-RON, mas marcando mais um par. Em *C. absconditus* que tem apenas 3 pares acrocêntricos, a Ag-RON está presente em um deles, e as demais marcações estão em st e sm, com o DNAr 18S confirmando estas marcações, mas marcando mais um par metacêntrico. Assim, numa comparação entre as três espécies notamos uma diferença no número de cromossomos com um braço (a) e mudança na posição dos pares organizadores nucleolares, sugerindo que os rearranjos carregaram a região organizadora do nucléolo. Isto pode ter sido facilitado porque estes sítios estão localizados em posição terminal dos cromossomos, exceto o sítio do par 1(m) em *P. denticulata* e *C. absconditus*. Nos gêneros menos derivados, ocorre até 4 sítios de DNAr 18S, sendo possível notar o aumento tanto do 2n como o de cromossomos de um braço.

É curioso que no gênero *Metynnis*, embora também tenha $2n=62$, os sítios de DNAr 18S estão em um ou dois pares de cromossomos (Favarato *et al.* 2021). Notadamente, a partir deste clado, há um aumento no número desses sítios, chegando a 14. No gênero *Serrasalmus*, as Ag-RONs também são C+ e estão presentes em posição terminal de cromossomos subtelo/acrocêntricos, sendo que a técnica de FISH também detectou outros sítios (Nakayama *et al.* 2008; 2012). Moreira-filho *et al.* (1984) consideram que as RONs associadas à heterocromatina terminal estão mais propensas a rearranjos cromossômicos e, conseqüentemente, sua dispersão pelo genoma, sendo que a inatividade de alguns sítios ribossomais é uma característica comum observada em peixes com RONs múltiplas (Nakayama *et al.* 2008). Segundo Moreira-Filho *et al.* (1984) e Vicari *et al.* (2008), a ocorrência de sítios de DNAr 18S adicionais àqueles marcados pelo nitrato de Prata, como visualizado nas espécies aqui analisadas, pode ser devido a eventos de dispersão das RONs, ou psdeudogenes, por rearranjos não Robertsonianos do tipo translocação ou movimentos associados à heterocromatina ou a elementos transponíveis (ET) (Terencio *et al.* 2012; 2015; Guimarães *et al.* 2016).

No clado em estudo, a dispersão da RON pode ter ocorrido por inversão e/ou translocação, rearranjos que estão intimamente relacionados às famílias de DNA ribossomal. Diante disso sugerimos dois cenários: 1) inversão pericêntrica em cromossomos acrocêntricos nucleolares, alterando a morfologia para cromossomos de dois braços (subtelo/submetacêntrico); 2) translocação de sequências de DNAr 18S de acrocêntricos para uma posição intersticial em cromossomo metacêntrico (par 1).

O primeiro cenário é suposto pela morfologia dos cromossomos (com dois braços) e que mantêm a atividade transcricional (Ag-RON). Enquanto no segundo cenário, que não apresentou atividade transcricional, teria sido transposição ou translocação facilitada por elementos transponíveis (ET), os quais invadem preferencialmente regiões de DNAr com conseqüente diversidade na sua localização dentro dos cariótipos, por sua natureza replicativa (Biémont e Vieira 2006). Em *P. striolatus*, o par 26(a) possui DNAr 18S bitelomérico, sendo que na região do braço curto está associado à HC, mas na região terminal dos braços longos não tem HC. Estas sequências podem estar associadas a ET (Terencio *et al.* 2015) e geralmente tornam-se inativas e propensas a acúmulo de mutações (inserções, deleções) em taxas neutras até perder completamente sua identidade ou se perder no genoma (Fernández-Medina *et al.* 2012).

Interessante notar que as três espécies apresentam o DNAr 5S apenas em um par, em associação com o bloco heterocromático intersticial no par 1(m). Esta localização em um par de cromossomos é conservada em muitos grupos de peixes, representando uma condição ancestral e que poderia conferir alguma vantagem para proteção deste gene no genoma das espécies (Martins e Galetti Jr 2001; Cioffi e Bertollo 2012). Contudo, várias diferenças em número e localização desta sequência (DNAr 5S) foram observadas na Família Serrasalminidae, variando de um a dois pares, com posição terminal ou intersticial, mas sempre colocalizada com heterocromatina (Nakayama *et al.* 2008; 2012; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019; 2021). O clado menos derivado, Colossomatinae, tem os sítios DNAr 5S localizados em dois pares, em posição intersticial, enquanto em Serrasaminae, estes sítios estão presentes em um ou dois pares, sendo que nas espécies com um par, a marcação é sempre intersticial e quando marca dois pares, em um a marcação é intersticial e no outro terminal (Nakayama *et al.* 2008; 2012; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019; 2021). Isso indica que rearranjos não-robertsonianos podem ter diminuído o número de sítios ou a marcação no segundo par pode tratar-se de um pseudogene (Martins *et al.* 2002). Por outro lado, acreditamos que o par cromossômico que carrega a sequência do DNAr 5S em posição intersticial pode ser homeólogo dentro da família Serrasalminidae (Nakayama *et al.* 2008; 2012; Ribeiro *et al.* 2014; Favarato *et al.* 2019). Neste sentido, a grande similaridade entre esses pares cromossômicos pode representar um importante marcador citotaxonômico, uma vez que possibilita a diferenciação dentre as espécies, como as do gênero *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, que muitas das vezes são confundidas pela sua similaridade morfológica.

Em *P. striolatus*, a dupla-FISH com sondas DNAr 18S e 5S evidenciou que estes sítios se encontram em pares cromossômicos diferentes, contudo, nas espécies *C. absconditus* e *P. denticulata* estes sítios estão em sintenia, com um dos sítios 18S (**Figura 5**), sendo que a análise por *Fiber-FISH* revelou que esses genes são adjacentes (**Figura 6**).

As famílias gênicas podem estar localizadas em cromossomos diferentes, como ocorre na maioria das espécies de peixes amazônicos, o que evitaria rearranjos desvantajosos entre estas duas regiões do genoma (Martins e Wasko 2004), entretanto, em algumas espécies podem estar em sintenia e nesse caso, adjacentes (intercaladas) ou colocalizadas (Guimarães *et al.* 2016; Favarato *et al.* 2021; Souza *et al.* 2021).

Em Serrasalminidae, sintenia entre DNAr 18S e 5S foi evidenciada em três espécies de *Metynnis*, na porção intersticial dos braços longos de *M. longipinnis* (par 3m), *M. cuiaba* (par 29a) e *M. hipsauchen* (par 10m) (Favarato *et al.* 2021). Os autores supõem que esta

característica foi propagada dentro do gênero e que pode conferir alguma vantagem adaptativa para a manutenção desta organização. Em Ctenoluciidae, a sintenia também foi evidenciada em *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850, onde o DNAr 18S apresenta atividade transcricional detectada pela técnica de Ag-RON (Souza *et al.* 2021). Os autores sugerem que a colocalização destas famílias multigênicas nesta espécie é uma característica independente. Já, em Erythrinidae, na espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), a sintenia pode ter sido causada pelo acúmulo de sequências repetitivas de DNA, pois os elementos transponíveis de *Rex 3* foram mapeados concomitantemente com genes ribossômicos (Guimarães *et al.* 2016).

A colocalização dessas classes de DNAr é uma característica incomum, uma vez que a dispersão dessas famílias multigênicas é resultado de eventos independentes e pode ser associada ao silenciamento desses genes (Vicari *et al.* 2008; Barros *et al.* 2011; Sochorová *et al.* 2018). Neste ponto, vale ressaltar que, em ambas espécies aqui analisadas, os sítios de DNA ribossomal 18S em sintenia não apresentou atividade transcricional (pela técnica de Ag-RON), o que indica que este sítio estava inativo durante a última intérfase. Vê-se, assim, a necessidade do uso de outros marcadores seja moleculares, como o sequenciamento e a caracterização das estruturas das famílias gênicas, uma vez que, poderiam trazer informações sobre a função ou pseudogenização, e marcadores citogenéticos, como ET e Histonas, afim de uma melhor compreensão acerca desses eventos de sintenia, dispersão, associação e contribuições citotaxonômicas (Traldi *et al.* 2019; Haerter *et al.* 2022).

A sintenia destes marcadores, teria surgido de maneira isolada nesses três gêneros, uma vez que *Metynnis* é grupo irmão de *P. striolatus*, que não apresentou tal característica. Diante destes dados, é possível inferir que a sintenia dos DNAr 18S e 5S é uma característica apomórfica para *P. denticulata* e *C. absconditus*, gerada por um evento de rearranjo cromossômico do tipo translocação ou transposição por ET. Isso reforça a similaridade e proximidade destas espécies.

Sequências teloméricas (TTAGGG_n) foram detectadas apenas nas porções terminais de todos os cromossomos das três espécies analisadas. Interessante notar que, embora a presença de rearranjos nos serrasalmídeos seja notória, apenas uma espécie até agora analisada apresentou Sequências Teloméricas Intersticiais (ITS), *Colossoma macropomum* (que compõe o clado basal da família), em um par metacêntrico, em posição centromérica, coincidindo com a heterocromatina (Ribeiro *et al.* 2014). As autoras sugerem que esta ITS não resultou de fusão, pois o número diploide foi mantido, nem devido à inversão, mas pode estar relacionada a DNAs satélites, transferidos de outras regiões por processos como *crossing-over* desigual,

transposição ou duplicação na heterocromatina (Schneider *et al.* 2013). Contudo, se considerarmos o cariótipo ancestral como $2n=54$ cromossomos com dois braços e que a evolução cromossômica na família foi para o aumento do número diploide com a presença de cromossomos com apenas um braço por fissão, é possível que ITS no clado basal tenha sido um ponto que favoreceu a quebra.

6. Conclusão

A caracterização citogenética clássica e molecular de três espécies de Serrasalmi permitiram algumas considerações:

- A manutenção do $2n=62$ nas três espécies, aqui analisadas, reflete sua relação como grupo-irmão de *Metynnis*, como proposta por Mateussi *et al.* (2020b), com base em caracteres moleculares.
- Um marcador citotaxonomico para as três espécies é um bloco de heterocromatina intersticial no par 1(m) associado com DNAr 5S, bloco que parece ser homeólogo na família, mas por conta de rearranjos tipo inversões e translocações, este par ocupa diferentes posições no cariótipo.
- A sintenia de DNAr 18S e 5S nas espécies *C. absconditus* e *P. denticulata* corroboram sua proximidade filogenética.
- A diversificação das fórmulas cromossômicas dentro do clado é também evidenciada pelas regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) e DNAr 18S, corroborando a presença de rearranjos não-Robertsonianos.
- O parafiletismo de “*Pristobrycon*”, suportado por dados morfológicos e moleculares, é refletido por dados citogenéticos, onde *P. striolatus* compartilha o número diploide com *Catoprion* e *Pygopristsis*, mas *Pristobrycon calmoni* (espécie tipo do gênero) compartilha o $2n$ com *Serrasalmus* ($2n=60$).

7. Referências Bibliográficas

- Acácio, M.; Varella, A.M.B.; Malta, J.C.O. 2012. The parasitic crustaceans of *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1776) (Characiformes: Serrasalmidae) from floodplain lakes of the Solimões River, Central Amazon, Brazil. *Neotropical Helminthology*, 6(2): 179-184.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. 1ª ed. Eduem, Maringá, 504p.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2017. *Molecular Biology of the Cell*. 6ª Ed. Garland, New York, 74p.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-filho, S.A.; Bernardino, G.; Ferrari, V.A.; Alcantara, R.C.F. 1987. Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: Tiews, K. (Ed.) *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, 1: 189-195.
- Almeida-Val, V.M.F.; Silva, M.N.P.; Caraciolo, M.C.M.; Mesquita, L.S.B.; Farias, I.P.; Val, A.L. 1992. LDH isozymes in Amazon fish - III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalmidae (Teleostei: Ostariophysi). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103B (1): 119-125.
- Andrade, M.C.; Giarrizzo, T.; Jegu, M. 2013. *Tometes camunani* (Characiformes: Serrasalmidae), a new species of phytophagous fish from the Guiana Shield, rio Trombetas basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 11(2): 297-306.
- Andrade, M.C.; Sousa, L.M.; Ota, R.P.; Jegu, M.; Giarrizzo, T. 2016. Redescription and Geographical Distribution of the Endangered Fish *Ossubtus xinguense* Jegu 1992 (Characiformes, Serrasalmidae) with Comments on Conservation of the Rheophilic Fauna of the Xingu River. *PLoS ONE*, 11(9): e0161398.
- Andrade, M.C.; Machado, V.N.; Jégu, M.; Farias, I.P.; Giarrizzo, T. 2017. A new species of *Tometes* Valenciennes 1850 (Characiformes: Serrasalmidae) from Tocantins-Araguaia River Basin based on integrative analysis of molecular and morphological data. *PLoS One*, 12(5): e0170053.
- Andrade, M.C.; Jégu, M.; Buckup, P.A.; Netto-Ferreira, A.L. 2018. A new *Myleus* species (Characiformes: Serrasalmidae) from the Rio Tapajós basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 92(6): 1902-1914.
- Barros, A.V.; Sczepanski, T.S.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. 2011. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture*, 322-323: 47-50.
- Barros, L.C.; Galetti Junior, P.M.; Feldberg, E. 2017. Mapping 45S and 5S ribosomal genes in chromosomes of Anostomidae fish species (Ostariophysi, Characiformes) from different Amazonian water types. *Hydrobiologia*, 1: 1-13.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-524.
- Bignotto, T.S.; Gomes, V.N.; Maniglia, T.C.; Boni, T.A.; Agostinho, C.S.; Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J. 2020. Molecular characterization and genetic relationships of seven piranha species of the genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* (Characiformes: Serrasalmidae) from

- Paraná-Paraguay, São Francisco and Tocantins River basins in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 80(4): 741-751.
- Calcagnotto, D.; DeSalle, R.; Schaefer, S.A. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(1): 135-153.
- Carvalho, R.A.; Dias, A.L. 2007. Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal locations of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1): 141-146.
- Centofante, L.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2002. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon Basin. *Caryologia*, 55(1): 37-45.
- Cestari, M.M.; Galetti Jr., P.M. 1992a. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay River: evolutionary and cytotoxic considerations. *Copeia*, 1: 108-112.
- Cestari, M.M.; Galetti Jr., P.M. 1992b. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotoxic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). *Brazilian Journal of Genetics*, 15(3): 555-567.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, M.A. (Ed.). *Repetitive DNA*. Vol. 7. Basel, Karger, 197-221p.
- Cione, A.L.; Dahdul, W.M.; Lundberg, J.G.; Machado-Allison, A. 2009. *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalminae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 29(2): 350-358.
- De Freitas Mourão, A.A.; Natal Daniel, S.; Teruo Hashimoto, D.; Cristina Ferreira, D.; Porto Foresti, F. 2017. Organization and Distribution of Repetitive DNA Classes in the *Cichla kelberi* and *Cichla piquiti* Genome. *Cytologia*, 82: 193-19.
- Dulz, T.A.; Lorscheider, C.A.; Nascimento, V.D.; Noletto, R.B.; Moreira-Filho, O.; Nogaroto, V.; Vicari, M.R. 2019. Comparative cytogenetics among *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements. *Comparative Cytogenetics*. 13(2):105-120.
- Eigenmann, C.H. 1915. The Serrasalminae and Myleinae. *Annals of Carnegie Museum*, 9(34): 226-272.
- Favarato, R.M.; Silva, M.; de Oliveira, R.R.; Artoni, R.F.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2016. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA Genes and Telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish*, 13(2): 103-110.
- Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Ota, R.P.; Nakayama, C.M.; Feldberg, E. 2019. Cytogenetic characterization of two *Metynnis* species (Characiformes, Serrasalminae) reveals B chromosomes restricted to the females. *Cytogenetic and Genome Research*, 158(1): 38-45.
- Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Campos, A.; Porto, J.I.R.; Nakayama, C.M.; Ota, R.P.; Feldberg, E. 2021. Comparative cytogenetics of Serrasalminae (Teleostei: Characiformes): The relationship between chromosomal evolution and molecular phylogenies. *PLoS ONE* 16(10): e0258003.

- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Brazil Journal Genetic* 15(2): 369-383.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Nakayama, C.M.; Bertollo, L.A.C. 1993. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome*, 36: 372-376.
- Fernández-Medina, R.D.; Ribeiro, J.M.C.; Carareto, C.M.A.; Velasque, L.; Struchiner, C.J. 2012. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 13: 272.
- Ferro, D.A.M.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.
- Freeman, B.; Nico, L.G.; Osentoski, M.; Jelks, H.L.; Collins, T.M. 2007. Molecular systematics of Serrasalminidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, 1484: 1-38.
- Fricke, R.; Eschmeyer, Wn.; Van Der Laan, R. (eds) 2020. Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Acesso em 02/12/2020.
- Fricke, R.; Eschmeyer, Wn.; Van Der Laan, R. (eds) 2022. Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Acesso em 14/06/2022.
- Galetti Jr., P.M. 1998. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology*, 65: 53-56.
- Gaviria, J.I.; Nirchio, M.; Granado, A.; Estrada, A. 2005. Karyotype and nucleolar organizer regions of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. *Interciencia*, 30(1): 44-47.
- Géry, J. 1972. Poissons Characoïdes des Guyanes. I. Généralités. II. Famille des Serrasalminidae. *Zoologische Verhandelingen*, 122: 1-250.
- Géry, J. 1977. *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 672p.
- Gonçalves, B.B.; Oliveira, M.S.B; Borges, W.F.; Santos, G.G.; Tavares-Dias, M. 2018. Diversidade de metazoários parasitas em *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae) do baixo rio Jari, um afluente do rio Amazonas no Brasil. *Acta Amazonica*, 48: 211-216.
- Gosline, W.A. 1951. Notes on the characid fishes of the subfamily Serrasalminae. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 27: 17-64.
- Goulding, M. 1980. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, Berkeley, 280p.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L. 1982. Life History and Management of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An Important Amazonian Food Fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 107-133.

- Grewal S.I.S.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revised. *Nature Reviews Genetics*, 8: 35-46.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 127: 43-53.
- Gross, 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.
- Guerra, M.S. 1988. *Introdução à Citogenética geral*. 2ª ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 142p.
- Guerra, M.S. 2012. *Citogenética molecular: Protocolos comentados*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 132p.
- Guimarães, E.M.C.; Carvalho, N.D.M.C.; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Gross, M.C. 2016. Karyotypic Comparison of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) in Central Amazon. *Zebrafish*, 14: 80-89.
- Haerter, C.A.G.; Margarido, V.P.; Blanco, D.R.; Traldi, J.B.; Feldberg, E.; Lui, R.L. 2022. Contributions to *Trachelyopterus* (Siluriformes: Auchenipteridae) species diagnosis by cytotaxonomic autapomorphies: from u2 snRNA chromosome polymorphism to rDNA and histone gene synteny. *Organisms Diversity & Evolution*, 1:1-18.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Davila, C.; Paugy, D.; Renno, J.F. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 16(10): 2115-2136.
- 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(17): 4780.
- Jégu, M. 1992. *Ossubtus xinguense* un nouveau genre et une nouvelle espèce du rio Xingu, Brésil (Teleostei; Serrasalmidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 3(3): 235-252.
- Jégu, M. 2003. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: Reis, R.E; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J (Ed.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, 182-196p.
- Kner, R. 1859. Zur familie der Characidae, III. Folge der ichthyologsichen Beitrage – Denkschr. K. Akad. Wiss. *Wien*, 17: 137-182.
- Kolmann, M.A.; Cohen, K.E.; Bemis, K.E.; Summers, A.P.; Irish, F.J.; Hernandez, L.P. 2019. Tooth and consequences: Heterodonty and dental replacement in piranhas and pacus (Serrasalmidae). *Evolution & Development*, 2019: e12306.
- Kolmann, M.A; Hughes, L.C; Hernandez, L.P; Arcila, D.; Betancur, R.; Sabaj, M.; López-Fernández, H. H; Ortí, G. 2021. Phylogenomics of Piranhas and Pacus (Serrasalmidae) Uncovers How Dietary Convergence and Parallelism Obfuscate Traditional Morphological Taxonomy. *Systematic Biology*, 2020: 70(3): 576-592.

- Leão, E.L.M.; Leite, R.G.; Chaves, P.T.C.; Ferraz, E. 1991. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramirez, 1965 (Pisces: Serrasalminidae) do Baixo rio Negro. *Revista Brasileira de Biologia*, 51(3): 545-553.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M.L.J.; Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 545-567.
- Lourenço, F.S.; Morey, G.A.M.; Pereira, J.N.; Malta, J.C.O. 2017. Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* Golvan, 1956 (Acantocephala: Neochinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Serrasalminidae) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. *Folia Amazônica*, 26(1): 1-8.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87(7): 433-438.
- Lundberg, J.G.; Sabaj Pérez, M.H.; Dahdul, W.M.; Orangel, A.; Aguilera, S. 2010. The Amazonian Neogene fish fauna. In: Hoorn, C.; Wesselingh, F. P. *Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past*. Blackwe, London, 281-301p.
- Machado, V.N.; Collins, R.A.; Ota, R.P.; Andrade, M.C.; Farias, I.P.; Hrbek, T. 2018. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports*, 8: 8387.
- Machado-Allison. 1983. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte II. Discussion sobre la condicion monofilética de la subfamilia. *Acta Biologica Venezuelica*, 11: 145-195.
- Machado-Allison, A. 1985. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae. Parte III: sobre el estatus genérico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei Characidae, Serrasalminae). *Acta Biologica Venezuelica*, 12(1): 19-42.
- Machado-Allison, A.; Fink, W.L. 1996. *Los Peces Caribes de Venezuela: Diagnosis, Claves, Aspectos Ecologicos y Evolutivos*. Monografía, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Colección. 52p.
- Maciel, H.M.; Soares, M.G.M.; Prestes, L. 2011. Reprodução da piranha-amarela *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858, em lagos de várzea, Amazonas, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(2): 97-102.
- Martins, C.; Galetti Jr. P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, C.; Galetti Jr. P.M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research*, 8: 353-355.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct non transcribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.

- Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Wright, J.M. 2000. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapia cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas*, 133: 39-46.
- Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Parise-Maltempi, P.P.; Wright, J. M.; Foresti, F. 2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Research*, 98:78-85.
- Martins, C.; Wasko, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C.R. (Ed.). *Focus on Genome Research*. New York: Nova Science Publishers, 335-363p.
- Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P.; Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - a review. *Aquaculture*, 231(1): 37-49.
- Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti Jr. 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. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds). *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. 421-453p.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; de Oliveira, S.G. 2010. Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. In: Urbano, K.V. (ed.). *Advances in Genetics Research*, 4: 1-81.
- Martins, N.F.; Bertollo, L.A.C.; Troy, W.P.; Feldberg, E.; Valentin, F.C.S.; Cioffi, M.B. 2013. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Fish Biology and Fisheries* 23(2): 261-269.
- Mateussi, N.T.B.; Melo, B.F.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2019. Molecular Data Reveal Multiple Lineages in Piranhas of the Genus *Pygocentrus* (Teleostei, Characiformes). *Genes*, 10(5): 2-18.
- Mateussi, N.T.B.; Melo, B.F.; Oliveira, C. 2020a. Molecular delimitation and taxonomic revision of the wimple piranha *Catoprion* (Characiformes: Serrasalminidae) with the description of a new specie. *Journal Fish Biology*, 97: 668-685.
- Mateussi, N.T.B.; Melo, B.F.; Ota, R.; Roxo, F.F.; Uchoa, L.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2020b. Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153: 106945.
- Melo, F.M.; Sidlauskas, B.L.; Near, T.J.; Roxo, F.F.; Ghezelayagh, A.; Ochoa, L.E.; Stiassny, M.L.J.; Arroyave, J.; Brant, C.; Faircloth, J.; Macguigan, D. J.; Harrington, R.C.; Benine, R. C.; Burns, M.D.; Hoekzema, K.; Sanches, N.C.; Maldonado-Ocampo, J.A.; Castro, R.M.C.; Foresti, F.; Alfaro, M.E.; Oliveira, C. 2022. Accelerated Diversification Explains the Exceptional Species Richness of Tropical Characoid Fishes. *Systematic Biology*, 71(1): 78-92.
- Menezes, N.A.; Backup, P.A.; Figueiredo, J.L.; Moura, E. R. L. 2003. *Catálogo das espécies*

de peixes marinhos do Brasil. 2ª ed. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 160p.

- Mirande, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.
- Moraes, J.N.; Ferreira, P.V.; Favarato, R.M.; Pinheiro-Figliuolo, V.S. Feldberg, E. 2022. Karyotype variability in six Amazonian species of the family Curimatidae (Characiformes) revealed by repetitive sequence mapping. *Genetics and Molecular Biology*, 45,2: e20210125.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.; Galetti Jr., P.M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 26: 564-568.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complexo. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 331-357.
- Moreira-Peres, A.W.; Bertollo, L.A.C.; Moreira Filho, O. 2006. Karyotypic characterization of *Myleus micans* (Lütken, 1875) (Pisces, Characidae, Serrasalminae). *Caryologia*, 59(2): 125-130.
- Morey, G.A.M.; Santana, H.P.; Malta, J.C.O. 2016. As espécies de Isopoda (Crustacea: Cymothoidea) parasitas de *Serrasalmus altispinis* Merckx, Jégu e Santos, 2000 (Characiformes: Serrasalmidae) coletadas em lagos de várzea da Amazônia, Brasil. *Folia Amazonia*, 25(2): 145-152.
- Muniz, M. 2009. *Citogenética*. Florianópolis: Biologia/EAD/UFSC, 124p.
- Muramoto, J.I.; Ohno, S.; Atkins, N.B. 1968. On the diploid state of the fish, order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24: 59-66.
- Murnane, J.P. 2012. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation Research*, 730: 28-36.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2000. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopreura* Kner, 1958 (Characiformes, Serrasalmidae) na região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 30(1): 149-154.
- Nakayama, C.M.; Jégu, M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2001. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* group (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia*, 2001(3): 866-869.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2002. A comparative cytogenetic study of five piranhas species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetica*, 114: 231-236.
- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2008. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4): 868-873.
- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalmidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 53-58.
- Nelson, E.M. 1961. The swimbladder in the Serrasalminae with notes on additional

- morphological features. *Fieldiana (Zoology)*, 39(56): 603-624.
- Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the world*. 5^a ed. Wiley. New York, USA. 130p.
- Nico, L.; Taphom, D. 1988. Food Habits of Piranhas in the Low Llanos of Venezuela. *Biotropica*, 20(4): 311-321.
- Nirchio, M.; Fenocchio, A.S.; Swarça, A.C.; Pérez, J.E.; Granado, A.; Estrada, A.; Ron, E. 2003. Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) and *Piaractus brachipomus* (CUVIER, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Caryologia*, 56(4): 405-411.
- Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C.; Benine, R.C.; Ortí, G.; Vari, R.P.; Corrêa e Castro, R.M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 1-25.
- Ortí, G.; Petry, P.; Porto, J.I.R.; Jégu, M.; Meyer, A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 169-182.
- Ortí, G.; Sivasundari, A.; Dietz, K.; Jégu, M. 2008. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetic and Molecular Biology*, 31: 343-351.
- Ota, R.P.; Röpke, C.P.; Zuanon, J.A.S.; Jégu, M. 2013. Serrasalminae. In: Queiroz, L.J., Torrente-Vilara, G., Ohara, W.M., Pires, T.H., Zuanon, J.A.S.; Dória, C. (Orgs.). *Peixes do rio Madeira, volume II, a ictiofauna do rio Madeira*. Dialetto Latin American Documentary, São Paulo, Brazil, 15-47p.
- Ota, R.P.; Machado, V.N.; Andrade, M.C.; Collins, R.A.; Farias, I.P.; Hrbek, T. 2020. Integrative taxonomy reveals a new species of pacu (Characiformes: Serrasalminae: *Myloplus*) from the Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 18(1): e190112.
- Padeken, J.; Zeller, P.; Gasser, S.M. 2015. Repeat DNA in genome organization and stability. *Current Opinion in Genetics & Development*, 31:12-19.
- Pinheiro, V.S.; Carvalho, N.D.M.; Do Carmo, E.J.; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Gross, M.C. 2016. Karyoevolution in *Potamorhina* (Cope, 1878) (Ostariophysi, Curimatidae): Using repetitive DNA for the elucidation of genome organization. *Zebrafish*, DOI: 10.1089/zeb.2015.1187
- Pinheiro-Frigiulo, V. S.; Goll, L.; Ferreira, V. P.; Feldberg, E.; Gross, M. C. 2020. First Record on Sex Chromosomes in a Species of the Family Cynodontidae: *Cynodon gibbus* (Agassiz, 1829). *Cytogenetic and Genome Research*, 160: 29-37.
- 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.
- 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' Hydrobiologie Tropicale*, 4: 287-289.
- Porto, J.I.R. 1999. *Análises cariotípicas e sequenciamento de mtDNA de populações de*

- Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da bacia Amazônica. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas. 120p.
- Porto, F.E.; Vieira, M.M.R.; Barbosa, L.M.; Borin-Carvalho, L.A.; Vicari, M.R.; Portela-Castro, A.L.B.; Martins-santos, I.C. 2014. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish*, 11: 318-324.
- Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W.M.; Pires, T.H.S.; Zuanon, J.; Doria, C.R.C. 2013. *Peixes do rio Madeira*. Santo Antônio Energia, São Paulo, 16p.
- Reis, R.E.; Albert, J.S.; Dario, F.D.; Mincarone, M.M.; Petry, P.; Rocha, L.A. 2016. Fish Biodiversity and Conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89: 12-47.
- Ribeiro, L.B.; Matoso, D.A.; Feldberg, E. 2014. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminidae species (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 37(1): 46-53.
- Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Schempp, W.; Capozzi, O.; Stanyon, R. 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, 108: 59-67.
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; de Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. 2012. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae) fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 739-749.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H. (Eds). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 345-373p.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J. 2009. *Peixes comerciais de Manaus*. 2º ed. Revisada. INPA, Manaus, 47p.
- Santos, R.N. 2012. *Estratégias reprodutivas de peixes de um rio impactado por empreendimento hidroelétrico na Amazônia Central*. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 43p.
- Santos, E.O.; Deon, G.A.; Vicari, M.R.; Cestari, M.M.; Moreira Filho, O; Almeida, R.B.; Oliveira, E.; Nogaroto, V.; Silva, H.; Pavanelli, C.; Bertollo, L.A.C. 2019. Cytogenetics and DNA barcode reveal an undescribed *Apareiodon* species (Characiformes: Parodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 42: 365-373.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2013. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviste Fish Biology Fisheries*, 23: 201-214
- Sene, V.F. De; Daniela, C.P.; Ferreira, C. 2015. Mapping of the Retrotransposable Elements Rex1 and Rex3 in Chromosomes of *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 146(4): 319-324.
- Sleen, P.V e Albert, J.S. 2017. *Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 08540.

- Sochorová, J.; Garcia, S.; Galvez, F.; Symonova, R.; Kovařík A. 2017. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma*, 127(1): 141-50.
- Souza, J.F.S.; Guimarães, EM.C.; Pinheiro-Figliuolo, V.S.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Feldberg, E. 2021. Chromosomal analysis of *Ctenolucius hujeta* Valenciennes, 1850 (Characiformes): A new piece in the chromosomal evolution of the Ctenoluciidae. *Cytogenetic and Genome Research*, 161: 195-202
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Teixeira, A.S.; Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 2006. EsteraseD and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 498-502.
- Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125: 224-234.
- Terencio M.L.; Schneider, C. H.; Maria, C.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012. Stable karyotypes: a general rule for the fish of the family Prochilodontidae? *Hydrobiologia*, 686: 147-156.
- Terencio M.L.; Schneider, C.H.; Maria, C.; Gross, M.C.; do Carmo, E.J.; Nogaroto, V.; de Almeida, M.C.; Artoni, R.F., Vicari, M. R.; Feldberg, E. 2015. Repetitive sequences: the hidden diversity of heterochromatin in prochilodontid fish. *Comparative Cytogenetics*, 9(4): 465-481.
- Thatcher, V.E. 1991. Amazon fish Parasite. *Amazoniana*, 11(3/4): 263: 572p.
- Thompson, A.W.; Betancur, R.R.; López-Fernández, H.; Ortí, G. 2014. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 81: 242- 257.
- Traldi, J.B.; Ziemniczak, K.; Martinez, F.M.J.; Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Schemberger, M.O.; Nogaroto, V.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2019a. Chromosome Mapping of H1 and H4 Histones in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): Dispersed and/or Co-Opted Transposable Elements?. *Cytogenetic Genome Research*, 158: 106-113.
- Varriale, A.; Torelli, G.; Bernardi, G. 2008. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA*, 14: 1492-1500.
- Velasco-Hogan, A.; Meyers, M. 2020. Bite force mechanics and allometry of piranha (Serrasalminidae). *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 115: 104-296.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A. 2008. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenetic Genome Research*, 122(1): 67-72
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal Fish Biology*, 76:

1094-1116.

- Vieira, I.; Géry, J. 1979. Crescimento diferencial e nutrição em *Catoprion mento* (Characoidei). Peixe lepdófago da Amazônia. *Acta amazonica*, 9(1): 143-146.
- Vieira, E.F.; Isaac, V.J.; Fabré, N.N. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characiformes: Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil. *Acta amazonica*, 24(4): 625-638.
- Zacardi, D.M.; Ponte, S.C.S.; Oliveira, L.S.; Cajado, R.A.; Santos, L.R. 2019. Área de desova e recrutamento para peixes de interesse comercial no baixo Amazonas: implicações para conservação. In: Ribeiro, J.C. e Santos, C.A. 2019. *A Face Multidisciplinar das Ciências Agrárias 2*. Editora: Atena cap. 3. 1-18.