UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PATRÍCIA CORRÊA DA SILVA

INTEGRAÇÃO DOS ESTUDOS CROMOSSÔMICOS E DNA BARCODING EM *RHAMPHICHTHYS* (PISCES: GYMNOTIFORMES)

Belém-Pará
Março de 2016

PATRÍCIA CORRÊA DA SILVA

INTEGRAÇÃO DOS ESTUDOS CROMOSSÔMICOS E DNA BARCODING EM *RHAMPHICHTHYS* (PISCES: GYMNOTIFORMES)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular (Sub-área: Citogenética)

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka

Belém-Pará

Março de 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Silva, Patrícia Corrêa da , 1983-
Integração dos estudos cromossômicos e DNA barcoding em rhamphichthys (pisces: gymnotiformes) / Patrícia Corrêa da Silva. - 2016.

Orientador: Julio Cesar Pieczarka.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2016.

1. Genética - peixes. 2. Gymnotiformes - cromossomo B. 3. Citogenética. I. Título.

CDD 22. ed. 576.58

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará – UFPA e financiado pelos seguintes órgãos**: CNPq, CAPES, FAPESPA.**

“Cada sonho que você deixa para trás, é um futuro que deixa de existir.” Steve Jobs

Dedico aos meus pais, Manoel e Amélia, a Cristina, o Wellington Brazão e a minha amada filha, Ingrid Sophia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter meus pais como alicerce da minha vida, o Sr. Manoel e a D. Amélia que com um amor incondicional, me auxiliam em todos os aspectos, tornando meus dias sempre cheios de incentivos e compreensão. Mãe, muito obrigada por me compreender em todos os momentos, e principalmente naqueles em que eu mais precisava do seu colo!

Tudo que sonho e as minhas conquistas são frutos do apoio de vocês dois, por fazerem do amor a base da nossa família. À minha irmã, Cristina e também a mamãe por estarem sempre dispostas a me ajudar, e dividirem comigo as tarefas de cuidar da Ingrid Sophia.

Ao Wellington Brazão, por todo o amor e incentivo. Muito obrigado por me compreender e apoiar, e me auxiliar no fosse necessário, ao longo destes anos de união. Todos vocês, junto com a nossa filhota, Ingrid Sofia são as pessoas que fazem eu ter ânimo de continuar nesta luta, atrás de grandes conquistas.

A todos que compõem o Laboratório de Citogenética pelo apoio, carinho, boa convivência e claro, ao meu orientador Júlio Pieczarka, a Profa. Cleusa Nagamachi, a querida Profa. Renata Noronha por todos os ensinamentos e até pelos puxões de orelha em quase 12 anos de convivência, e por toda a compreensão, pelas oportunidades vividas e principalmente pelo incentivo na busca deste título. Ser grata a todos os ensinamentos e as experiências que vivi é o mínimo, já que entrei neste laboratório para um estágio voluntário e estou saindo com um título de doutora.

À Concita e a Shirley, pelo carinho e por estarem sempre disposta a nos ajudar em todos os momentos. Ao Jorge, que acompanhou minha trajetória desde a iniciação científica, cheio de conselhos e dispostos a ouvir nossos lamentos.

Aos peixólogos: Danillo, Susana, Adauto, Ingrid, Karina, David, Augusto, Fernando, e os demais alunos que foram compor posteriormente a equipe, em especial a Tayana, o Bruno, Vergiana e Thayse muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos principalmente, pelas colaborações nos momentos mais árduos. Aos participantes eventuais, mas não menos importantes para o bom andamento do trabalho, Sr. Jonas Alves, William Crampton e Prof. Wolmar pela classificação taxonômica dos peixes, Profa. Wilsea Ready e Prof. John Ready pelo acolhimento e colaboração junto com seus alunos no IECOS-Bragança.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, à CAPES, PRONEX, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, IBAMA pelas autorizações e UFPA, e todos que compõem o PPGBM.

Aos antigos diretores da Escola Francisco Espinheiro Gomes: Simone Oliveira, José Messias e Roberto Carlos, e também pela atual gestão, em especial a Heliene Wanderley pelo apoio e compreensão que tiveram nestes três anos que estou na instituição, principalmente por me dispensarem sempre que necessário, para que eu fosse capaz de concluir minha tese.

Às minhas amigas, Paula, Rita, Emília, Lidiane, Rosana, Soelma, Cintia que ao longo destes três anos, tornaram minhas viagens para Castanhal sempre alegres e descontraídas, o meu muito obrigada, vocês sempre serão parte de minha história.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 9

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM GYMNOTIFORMES 9

1.2. A FAMÍLIA RHAMPHICHTHYIDAE 12

1.3. A CITOGENÉTICA E OS GYMNOTIFORMES 14

1.4. CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS, CROMOSSOMOS B OU CROMOSSOMOS EXTRAS 16

1.5. UTILIZAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR COMO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES: "BARCODING" 19

1.6. O DNA REPETITIVO COMO FERRAMENTA DE COMPREENSÃO DO GENOMA DOS PEIXES 20

2. **OBJETIVOS** 25

2.1. GERAL 25

2.2. ESPECÍFICOS 25

3. **CAPÍTULO I: INTEGRAÇÃO DA CITOGENÉTICA COM DNA BARCODING IDENTIFICA OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES CRÍPTICAS EM RHAMPHICHTHYS** 26

4. **CAPÍTULO II: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO DNA REPETITIVO COMO FERRAMENTA DE DIVERSIDADE CARIOTÍPICA, EM RHAMPHICHTHYS** 43

5. **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 55

6. **REFERÊNCIAS** 57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Características morfológicas da Ordem Gymnotiformes em um representante da Família Apteronotidae (Apteronotus albifrons). Espécime fotografado no Laboratório de Citogenética da UFPA..... 10

Figura 2 - Caracterização do órgão de descarga elétrica. Exemplar de Gymnotus mamiraua, demonstrando a posição e estrutura do órgão elétrico Crampton (2006). 10

Figura 3 - Filogenia proposta por Albert & Crampton (2005), com modificações na imagem original. 12

Figura 4 - Representante da Família Rhamphichthyidae pertencente ao gênero Rhamphichthys. Registro de espécimes coletados pela equipe de peixe do Laboratório de Citogenética – UFPA. 13

Figura 5 - Árvore filogenética com dados cromossômicos baseada em Albert (2001) (a); Árvore filogenética com dados cromossômicos baseada em Alves-Gomes *et al.* (1995) e Sullivan, 1997 (b). Imagem retirada de Cardoso *et al.* (2011). 16

Resumo

A Ordem Gymnotiformes é composta por 219 espécies válidas, que estão distribuídas em cinco famílias. Os gêneros mais investigados são *Eigenmannia* e *Gymnotus.* Nosso trabalho concentrou-se na família Rhamphichthyidae, gênero *Rhamphichthys* que, assim como os demais Gymnotiformes, apresentam maior abundância e diversidade na região Amazônica. Foram realizadas coletas nos municípios de Abaetetuba, Barcarena e Belém (Pará) e em Tefé, Reserva Ecológica de Mamirauá (Amazonas), com objetivo de melhor definir as espécies, através da integração de dados citogenéticos clássicos, citogenômicos (através das sondas de sequências repetitivas de DNA) e do DNA Barcoding e assim compreender a evolução deste gênero de peixes na Amazônia. Foram identificados um novo citótipo para o gênero *R. rostratus* com a presença de cromossomos B e fórmula cariotípica FC=48m/sm+2st/a+(5-10)B, um novo citótipo da região do Amazonas, *Rhamphichthys sp*. FC = 44m/sm +6st/a, e também de *R. marmoratus,* FC = 46+4st/a no estado do Pará. A análise das sequências repetitivas nos novos citótipos demonstrou que as sondas de 18S são coincidentes com as regiões de constrição secundárias que são marcadas com nitrato de prata na técnica de coloração clássica da NOR. As sondas de DNA 5S marcam sítios múltiplos, deixando evidente que a evolução da família de genes ribossomais ocorre de maneira independente, pelo menos no gênero *Rhamphichthys*. Os retroelementos REX1 e REX3 marcaram de forma dispersa pelo genoma, como já foi descrito na literatura para outros peixes. O elemento REX1 marca ainda a região de constrição secundária em *R. rostratus*, o que também já foi descrito em outras espécies de peixes que habitam ambientes poluídos, expostos a estresses ambientais e também em indivíduos híbridos. A análise de DNA barcoding permitiu a construção de uma árvore bayesiana, que está de acordo com os dados de citogenética. Assim, as populações de *R. rostratus* com e sem cromossomos B constituem taxa distintos. Por sua vez, a amostra de Mamirauá, aqui denominada *Rhamphichthys* sp. por não haver sido descrita formalmente, é mais similar tanto nos dados cariotípicos como na análise de barcoding a *R. hanni* do Sudeste brasileiro. Nossos dados apontam para um número subestimado de espécies em *Rhamphichthys*, o que reforça a necessidade de uma revisão taxonômica para o gênero.

Palavras – chaves: Cromossomo B, Retroelementos REX, Rhamphichthyidae, DNA Barcoding.

Abstract

The Order Gymnotiformes is composed by 219 valid species, which are distributed in five families. The most investigated genera are *Eigenmannia* and *Gymnotus*. Our work focused on family Rhamphichthyidae, genus Rhamphichthys that, like other Gymnotiformes, present greater abundance and diversity in the Amazon region. Sampling was carried out in the municipalities of Abaetetuba, Barcarena and Belém (Pará) and Tefé, Ecological Reserve Mamirauá (Amazonas), in order to better define the species, through the integration of classical cytogenetic data, cytogenomic analysis (probes for repetitive DNA sequences) and DNA Barcoding and thus understand the evolution of this fish in the Amazon. A new karyotype was identified for *R. rostratus* with the presence of B chromosomes and karyotype formula FC = 48m / sm + 2st / a + (5-10) B, as well as a new cytotype from the Amazon region, in *Rhamphichthys* sp. FC = 44m / sm + 6st / a, and also in *R. marmoratus*, FC = 46 + 4st / a in the state of Pará. The analysis of repetitive sequences in the new cytotypes demonstrated that probes 18S coincided with the regions of constriction secondary that are marked with silver nitrate in the classical NOR staining technique. The DNA probes 5S mark multiple sites, letting clear that the evolution of the ribosomal gene family is independent, at least in the genus *Rhamphichthys*. Retroelements REX1 and REX3 marked in a dispersed fashion throughout the genome, as already described in literature for other fishes. The REX1 element also marks the secondary constriction in *R. rostratus*, which has also been described in other species of fishes that inhabit polluted environments, exposed to environmental stresses and also in hybrid individuals. The barcoding DNA analysis allowed the construction of a Bayesian tree, which is in agreement with the cytogenetic data. Thus, populations of *R. rostratus* with and without B chromosomes are separate taxa. In turn, the sample from Mamirauá, herein called *Rhamphichthys* sp., since it was not been formally described, it is more similar in both karyotypic data as the barcoding analysis with *R. hanni* from southeastern Brazil. Our data let clear that the number of species in *Rhamphichthys* is underestimated, which reinforces the need for a taxonomic revision of the genus.

Key – words: Chromosome B, REX Retroelements, Rhamphichthyidae, DNA Barcoding.

INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM GYMNOTIFORMES

A região Neotropical abriga a mais diversa ictiofauna de água doce do mundo, composta por aproximadamente 7000 espécies, sendo Ostariophisi o grupo mais diverso. Neste, 75% das espécies conhecidas encontram-se distribuídas nas Ordens Characiformes, Siluformes, Cypriniformes e Gymnotiformes (Reis *et al.*, 2003; Nelson, 2006; Oliveira *et al.*, 2007).

A Ordem Gymnotiformes apresenta 219 espécies formalmente descritas, e este número vem aumentando nos últimos anos. Eles se distribuem amplamente pela região Neotropical, com registros desde o Sul do México (15° N) até o norte da Argentina (36° S), com maior distribuição e diversidade de espécie na Bacia Amazônica. O aperfeiçoamento dos métodos de coletas, como por exemplo, a utilização dos detectores de peixes elétricos, as novas técnicas de identificação taxonômica e coleta de amostragem em ambientes pouco explorados estão possibilitando que novas espécies sejam encontradas e descritas (Tagliacollo *et al.*, 2016; Crampton, 2011; Crampton *et al.*, 2005; Albert & Crampton, 2003; Alves-Gomes, 1998).

Os Gymnotiformes são distintos dos outros peixes neotropicais pela sua morfologia típica. Seus representantes possuem forma do corpo alongada e lateralmente comprimida, nadadeiras dorsal e caudal ausentes (com exceção dos apteronotídeos), nadadeira anal bastante longa, órgãos internos compactados na porção anterior do corpo, e o ânus localizado na mesma direção da nadadeira peitoral (Figura 1). No entanto, a característica mais marcante deste grupo é a presença de um órgão elétrico e vários tipos de células sensoriais especializadas (eletrócitos), que permitem a habilidade de gerar e detectar potenciais elétricos na água. Esses campos magnéticos servem de sinalizações para indicação de parceiros sexuais, obstáculos e defesas (Bullock *et al.*, 1965; Alves-Gomes, 1998).

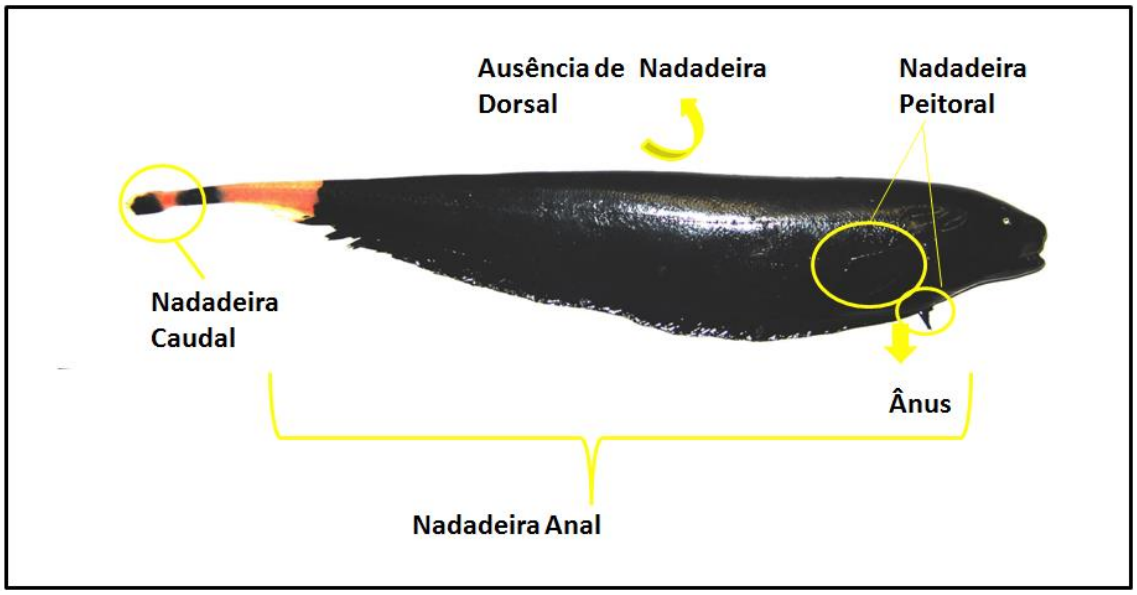

Figura 1 - Características morfológicas da Ordem Gymnotiformes em um representante da Família Apteronotidae (*Apteronotus albifrons*). Espécime fotografado no Laboratório de Citogenética da UFPA.

Este sistema eletrogênico e eletrosensorial (ESS) (Figura 2), por permitir a detecção de campos elétricos concomitantes, sugere que tal característica possibilita os Gymnotiformes serem, naturalmente mais ativos à noite, e possuírem uma visão ineficiente e pressão predatória reduzida. (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1996; Nanjappa *et al.*, 2000; Gouvêa *et al.*, 2002; Crampton, 2006).

A Ordem Gymnotiformes apresentou muitas controvérsias quanto à classificação e às relações filogenéticas dos grupo. Dependendo do autor os peixes desta Ordem podem ser classificados de cinco a sete famílias: Electrophoridae, Gymnotidae, Sternopygidae, Eigenmannidae, Hipopomidae, Rhamphichthydae e Apteronotidae variando a constituição de famílias e gêneros (Mago- Leccia, 1994; Alves –Gomes *et al.*, 1995; Albert e Campos-da-Paz, 1998).

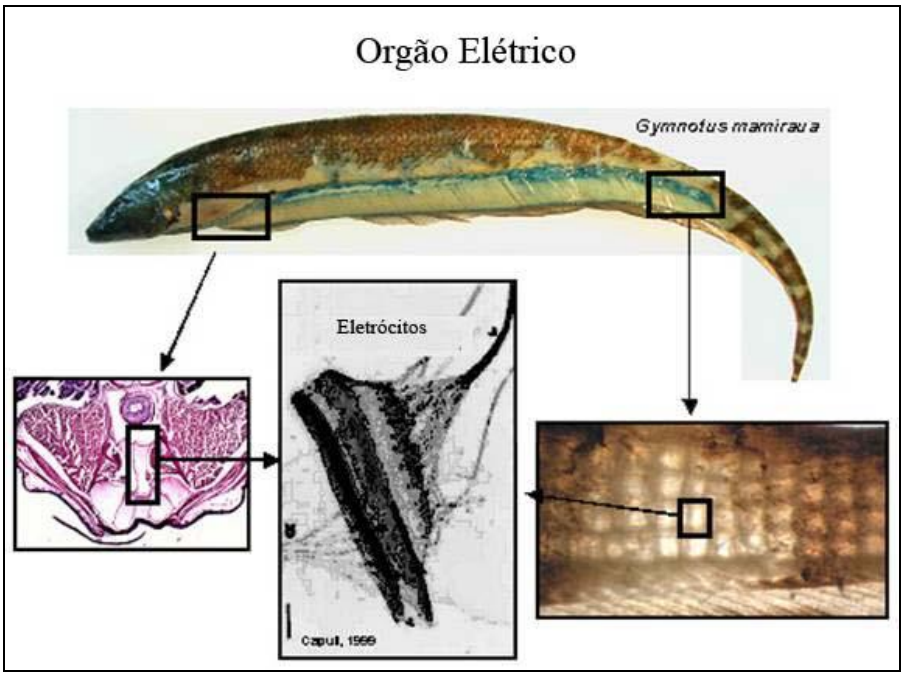

Figura 2 - Figura 2 - Caracterização do órgão de descarga elétrica. *Exemplar* de Gymnotus mamiraua, demonstrando a posição e estrutura do órgão elétrico Crampton (2006).

Entretanto, a proposta filogenética mais aceita recentemente é a de Albert e Crampton (2005) que corrobora os dados de Albert (2001), que utilizou o método de análise de máxima parcimônia (MP) com 249 caracteres entre dados morfológicos e moleculares combinados, neste ele incluem todos os dados até então avaliados por (Triques, 1993; Gayet *et al.*,1994; Alves-Gomes *et al.*,1995; Albert & Fink, 1996; Sullivan, 1997; Campos-da-Paz & Albert, 1998) e sua análise pode ser considerada a mais abrangente. O autor propõe que a ordem possui cinco famílias, que a família Gymnotidae ocupa a posição mais basal em relação aos outros gymnotiformes e que Rhamphichthydae e Hypopomidae formam um grupo monofilético, assim como Sternopygidae e Apteronotidae. Sendo, Gymnotidae clado irmão de Rhamphichthydae + Hypopomidae, e também de Sternopygidae + Apteronotidae (Figura 3). Recentemente, Tagliacollo *et al.* (2016) vem reafirmar a filogenia do grupo corroborando com estes dados já apresentados por Albert (2001).

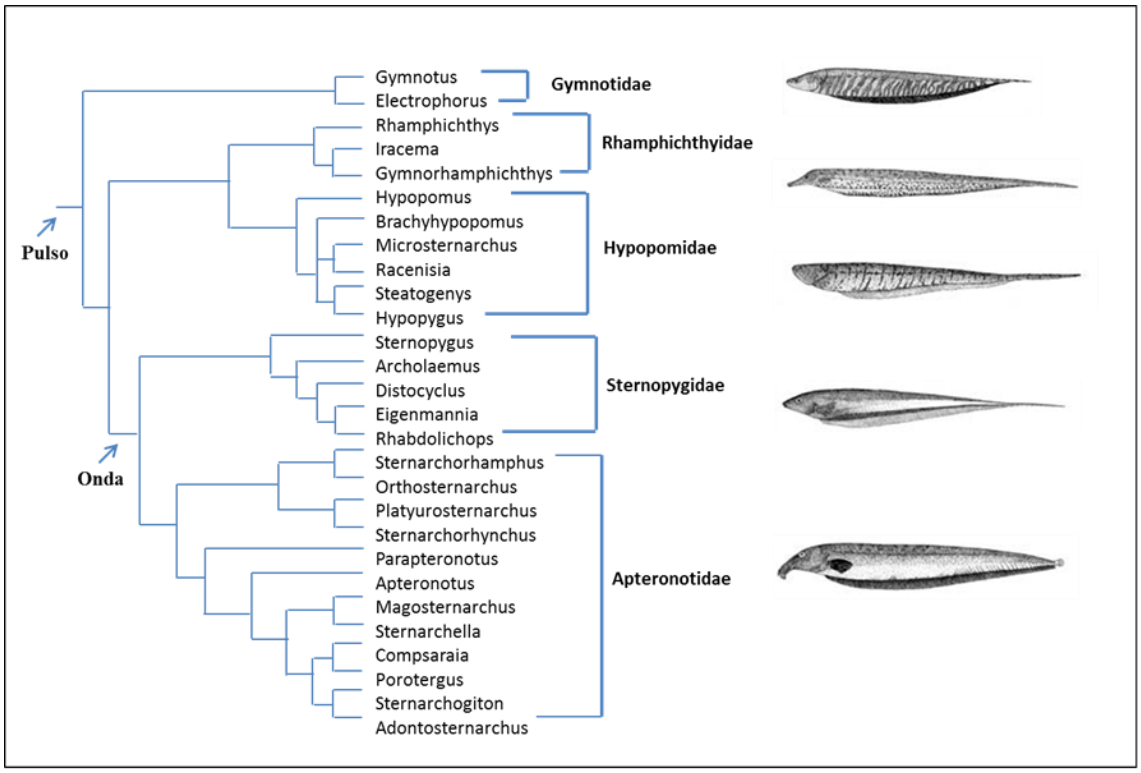

Figura 3 - Filogenia proposta por Albert & Crampton (2005), com modificações na imagem original.

1.2. A FAMÍLIA RHAMPHICHTHYIDAE

Os trabalhos publicados até agora sobre a família Rhamphichthyidae Regan, 1911 assim como os demais Gymnotiformes, são mais intensamente concentrados nas áreas de sistemática e taxonomia (Mago-Leccia, 1994; Triques, 1996). Apesar disso, o entendimento da diversidade dentro dos gêneros permanece incompleto, estando notória a necessidade de uma revisão para o gênero *Rhamphichthys* (Campos-da-Paz e Paepke, 1994; Albert e Crampton, 2005; Carvalho e Albert, 2015).

A última revisão da literatura foi feita por Triques (1999) onde se determinou que a família Rhamphichthyidae é constituída por três gêneros: *Rhamphichthys* Müller & Troschel (1848) com oito espécies válidas, *Gymnorhamphichthys* Ellis (1912) com quatro e *Iracema* Triques (1996) com apenas uma espécie descrita (Triques, 1996; Albert & Crampton, 2005). Foi descrita a espécie *Rhamphichthys helios* (Carvalho e Albert, 2015), aumentando para nove o número de espécies válidas para a família Rhamphichithyidae. A taxonomia da família ainda é pouco entendida, se comparado a outros Gymnotiformes, devido a dúvidas em relação aos limites entre espécies, já que seus exemplares apresentam variações tanto em sua natureza intraespecífica quanto

interespecífica. Todos os trabalhos de filogenia de Gymnotiformes concordam que Rhamphichthyidae é grupo irmão de Hipopomidae (Alves-Gomes, 1998; Albert, 2001; Albert & Crampton, 2005).

Segundo Mago-Leccia (1994) *Rhamphichthys* se distingue por apresentar focinho longo e tubular, ausência de dentes nas maxilas, câmara anterior da bexiga natatória vestigial e encerrada numa cápsula óssea e também mais de 300 raios na nadadeira anal (Figura 4). É entre os Gymnotiformes adultos, o que apresentam o segundo maior tamanho corporal, chegando a um metro de comprimento, perdendo em comprimento somente para as enguias elétricas da amazônica, conhecidas popularmente, como poraquê (Santos *et al*, 2004). Apresentam descargas do órgão elétrico em forma de pulso que são utilizados para forrageio, eletrolocalização e reconhecimento de parceiros sexuais (Nanjappa *et al.*, 2000; Gouvêa *et al.*, 2002; Ferraris, 2003). São animais filtradores que nadam pouco e se encontram durante o dia parados no substrato (Triques, 2005; Albert & Crampton, 2005). Assim como os demais Gymnotiformes, *Rhamphichthys* se apresenta em maior abundância e número de espécies na Bacia Amazônica (Crampton,1998; Albert, 2001; Albert & Crampton, 2005).

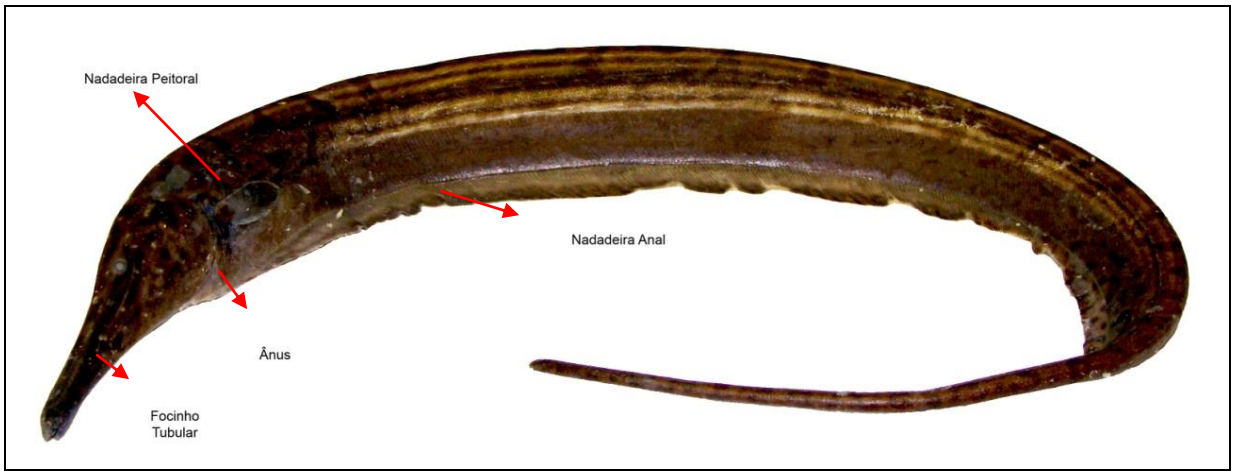

Figura 4 - Representante da Família Rhamphichthyidae pertencente ao gênero *Rhamphichthys*. Registro de espécimes coletados pela equipe de peixe do Laboratório de Citogenética – UFPA.

1.3. A CITOGENÉTICA E OS GYMNOTIFORMES

Os Gymnotiformes são um grupo de peixes altamente interessante como objeto de estudo, devido a sua alta variabilidade cromossômica associada a sua conservação morfológica. Estas características sugerem a existência de espécies crípticas, como já proposto para o gênero *Gymnotus* por Milhomem *et al.* (2008). Portanto é de grande importância a análise citogenética tanto no que se refere ao número diploide e morfologia cromossômica quanto para a localização de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs), distribuição da heterocromatina (DNA altamente repetitivo), já que tais características podem ser consideradas como marcadores populacionais em espécies de peixes, fornecendo dados citotaxonômicos que auxiliem na identificação das espécies e até mesmo separar espécies muito semelhantes morfologicamente, além de poder propor espécies ainda não descritas ou detectar variações cromossômicas populacionais, sendo possível fazer inferências de grupos conservativos e não conservativos (Silva *et al.*, 2008; Milhomem *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2005; Pieczarka & Mattevi, 1998).

Existem poucos estudos citogenéticos sobre este grupo. Segundo Oliveira *et al.* (2009) apenas 48 espécies dessa ordem já tem seu cariótipos descritos, mas nos últimos anos o número de publicações vem aumentando, e demonstram que a ordem Gymnotiformes apresenta grandes diferenças em relação ao número de cromossomos e sua estrutura (Artoni *et al.*, 2000). Esta diversidade cariotípica pode ser demonstrada com a variação do número diploide de 2n = 24 em *Apteronotus albifrons* (Apteronotidae) (Almeida-Toledo, 1981) a 2n = 54 em *Gymnotus carapo, G. mamiraua, G. paraguensis* (Gymnotidae), tendo também sido descrito um triploide de *G. carapo* com 2n = 81 cromossomos (Milhomem *et al.*, 2007; Lacerda & Maistro, 2007; Fernades-Matiolli *et al.*, 1998a; Foresti *et al.*, 1984).

Os gêneros *Gymnotus* e *Eigenmannia* são os mais estudados citogeneticamente até o presente e apresentam grande diversidade cromossômica. Além da variação morfológica e numérica de cromossomos, foi também relatada a presença de sistemas sexuais do tipo XX-XY com heterocromatinização do X e do tipo ZZ-ZW em *E. virescens* em populações precedentes da Bacia Amazônica e da Bacia do Rio São Francisco (MG), ambas as populações apresentaram 2n= 38 cromossomos, onde a primeira apresentou o macho como par heterogamético, caracterizando o sistema sexual XX/XY e na segunda população as fêmeas apresentaram um par heterogamético, caracterizando um mecanismo sexual ZZ/ZW (Almeida-Toledo *et al.*, 2001; Almeida-

Toledo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009) Além, de relatos de cromossomos sexuais múltiplos em representantes de três famílias de Gymnotiformes: *Brachyhypopomus pinnicaudatus,* que apresenta 2n= 42 para fêmeas e 2n= 41 para machos. Os cromossomos da fêmea são todos acrocêntricos e do macho 41 acrocêntrico e 1 metacêntrico. O sistema múltiplo de cromossomos sexuais ($X_1X_1X_2X_2$/ X_1X_2Y) se origina por translocação Robertsoniana (Hypopomidae) (Almeida-Toledo *et al.*, 2000a); *Eigenmannia sp*. (Almeida-Toledo *et al.*, 2005); *E. virescens* (Almeida-Toledo *et al.*, 2000b) (Sternopygidae) e *Gymnotus carapo* (Gymnotidae) (Silva & Margarido, 2005).

Portanto, a grande variação cariotípica presente nos demais Gymnotiformes, leva a crer que a família Rhamphichthyidae possa apresentar variações cromossômicas significativas. Entretanto, dados citogenéticos na família Rhamphichthyidae são exíguos, havendo apenas uma descrição formal na literatura por Almeida-Toledo, 1978 (*in* Oliveira, 1988) sobre a espécie *Rhamphichthys* cf. *pantherinus* com 2n = 52 (38m +10sm+ 4st) proveniente de Humaitá (AM). Contudo é provável que a espécie tenha sofrido um erro de classificação taxonômica, pois não há a confirmação de tal espécie dentre as validadas para o gênero *Rhamphichthys.* Pode-se supor que *Rhamphichthys* cf. *pantherinus* e *Gymnotus pantherinus* sejam provavelmente sinônimos por apresentarem o mesmo número diplóide 2n= 52 e fórmula cariotípica semelhante (38m + 8sm + 6st/a).

A espécie *Rhamphichthys hahni* com 2n = 50 e fórmula cariotípica (20m + 24sm + 6a) é caracterizada por Mendes *et al.*, (2012). Duas outras espécies *Rhamphichthys marmoratus* (44m/sm + 6a) e *Rhamphichthys rostratus* (42m/sm+ 8a) oriundas da Bacia Amazônica também foram caracterizadas com 2n = 50 (Silva, 2013).

Estes dados sugerem conservação do número diploide para a família Rhamphichthyidae e corroboram com os dados encontrados por Cardoso *et al.* (2011), no qual considera tal característica como sinapomorfia para a superfamília Rhamphichthyoidea.

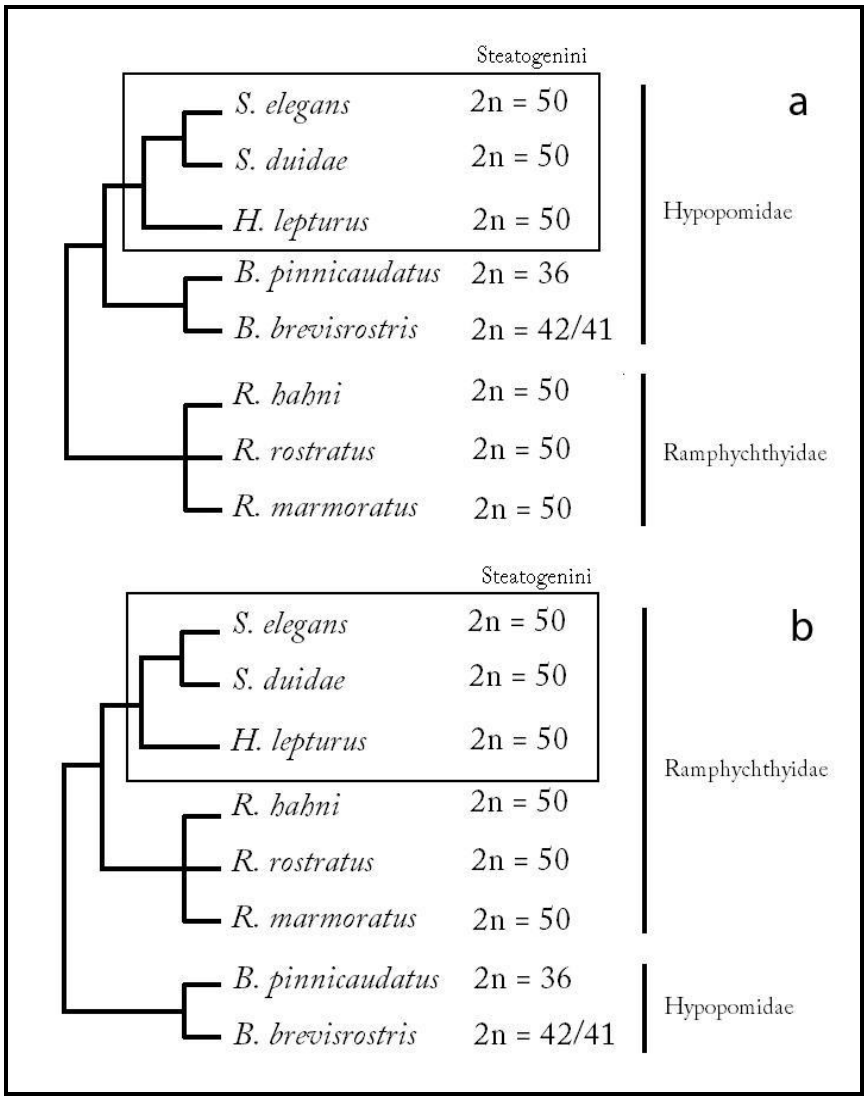

Figura 5 - Árvore filogenética com dados cromossômicos baseada em Albert (2001) (a); Árvore filogenética com dados cromossômicos baseada em Alves-Gomes *et al.* (1995) e Sullivan, 1997 (b). Imagem retirada de Cardoso *et al.* (2011).

1.4. CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS, CROMOSSOMOS B OU CROMOSSOMOS EXTRAS

Cromossomos B são reconhecidos como dispensáveis, por serem adicionais e geralmente morfologicamente distintos dos cromossomos do complemento A. Podem ser encontrados em todos os grupos taxonômicos e apresentam um padrão evolutivo independente dos demais cromossomos, não seguindo um padrão mendeliano de herança (Camacho *et al.,* 2000).

Entretanto a visão tradicional que provavelmente sua origem se dá a partir do complemento A ainda é bem aceita, pois estes cromossomos extras podem ter origem

em uma série de maneiras, incluindo a derivação de cromossomos autossomos e cromossomos sexuais de forma intra-específica, através da ocorrência de mecanismos como fragmentação de cromossomos e amplificação de regiões pericentroméricas fragmentadas. Sua evolução molecular posterior se assemelha ao de cromossomos sexuais, que envolve o silenciamento de genes, heterocromatinização e o acúmulo de DNA repetitivo e transposons. Estes eventos fazem com que estes cromossomos possam se apresentar em números variados na mesma espécie (Camacho *et al.*, 2000).

Estes cromossomos extras podem apresentar diferentes morfologias: metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e microcromossomos. Podem apresentar composição genômica diversificada dependendo de sua origem, pois geralmente são relatados como ricos em sequências repetitivas de DNAs satélites e sequências teloméricas que lhes confere estabilidade no ciclo celular, dependendo da possível origem intra ou interespecífica. Além da origem intraespecífica eles podem surgir de forma interespecífica por cruzamentos de espécies próximas (Beukeboom, 1994; . McAllister e Werren, 1997). A presença destes cromossomos pode se diferenciar de acordo com a distribuição geográfica da espécie, como demonstrado nos estudos com o gafanhoto *Eyprepocneudamis plorans* (Camacho, 2005).

Uma dos primeiros trabalhos de descrição de cromossomos B em peixes neotropicais foi feito por Pauls e Bertollo (1983), onde carcterizaram os supranumerários encontrados na espécie *Prochilodus lineatus*.

Em peixes neotropicais estes cromossomos supranumerários já foram encontrados em 61 espécies, distribuídas em 16 famílias de 7 bacias hidrográficas distintas. Destas, a Ordem Characiformes apresenta 31 espécies distribuídas em seis famílias: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Parondontidae, Prochilodontidae (Carvalho, 2008; Sampaio *et al.*, 2011). Na literatura, somente uma espécie da Ordem Gymnotiformes, *Apteronotus albifrons*, oriundo da Bacia do Paraná, tem registrado a presença de cromossomos B (Mendes *et al.*, 2012).

Porto *et al.*, (2010) estudando a subfamília Loricariinae da Ordem Siluriformes, encontrou na espécie *Rineloricaria pentamaculata* a variação do número diploide 2n= 56 a 59, devido a presença de 0-3 microcromossomos B do tipo acrocêntricos totalmente heterocromáticos, sendo esta variação numérica tanto inter, quanto intra- individual, sugerindo que estes microcromossomos são fragmentos oriundos de rearranjos cromossômicos.

Atualmente as pesquisas relacionadas à citogenética de peixes se baseiam em investigações sobre a composição e origem dos cromossomos B através de sondas de sequências repetidas de DNA que sejam capazes de demonstrar a composição genômica das espécies (Voltolin, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Fantinatti (2011), analisando por citogenética clássica e molecular o cariótipo de *Haplochromis obliquidens* (Perciformes- Cichlidae) encontrou a variação de 1 a 2 cromossomos B. Análises de citogenômica envolvendo hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de elementos transponíveis, frações genômicas de DNA altamente repetitivos (C_ot- 1 DNA) e genoma total (Comparative Genomic Hybridization- CGH), junto à análises morfológicas sugere que os portadores de cromossomos B apresentam uma provável vantagem adaptativa, pois os indivíduos que são portadores do cromossomo B apresentam uma menor variação morfológica, e as fêmeas escolhem os machos pelo caráter visual. A análise de sondas de DNA repetitivo evidenciou similaridades com o primeiro par cromossômico, sugerindo a provável origem do complemento A.

Silva *et al.* (2014) investigaram a origem do cromossomos B em *Astyanax paranae*, e através da produção de sondas específicas de cromossomos B verificaram que ele se tratava de um isocromossomo, pois a técnica de FISH revelou a presença de sequências de DNA do cromossomos B ao longo de todo o cromossomo supranumerário e a presença da histona H1 e os genes 18S DNAr, dispostos de forma simetricamente em ambos os braços cromossômicos.

Os avanços das técnicas de biologia molecular e o advento do sequenciamento *Next Generation* possibilitou Valente *et al.*, (2014) sequenciar genomas completos de peixes ciclídeos da espécie *Astatotilapia latifasciata* com e sem B e através da microdisecção destes cromossomos supranumerários foram feitas sondas para estudar a origem e a composição destes cromossomos. Foram verificados que eles apresentam milhares de sequências de DNA duplicadas, que tiveram sua origem em um cariótipo ancestral. Embora tenha sido verificado que a maioria dos genes dos cromossomos B estavam fragmentados, alguns genes encontravam-se intactos e com evidencia de que pelo menos três deles estavam transcricionalmente ativos.

Assim Valente *et al.*, (2014) concluiram que a origem do cromossomos B em *Astatotilapia latifasciata* se deu a partir dos cromossomos autossomos de cariótipos ancestrais, já que as sequencias provenientes incluem genes codificadores de proteínas e elementos transponíveis, sendo sugerido que estes genes intactos em B estejam

envolvidos na organização de microtúbulos e na formação do cinetócoro, sendo essenciais para o desenvolvimento normal do ciclo celular.

1.5. UTILIZAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR COMO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES: "DNA BARCODING"

O DNA Barcoding é uma proposta de identificação de espécies através do sequenciamento de um pequena região de um gene mitocondrial. O gene da subunidade I do Citocromo C oxidase (COI) foi eleito como a sequencia "barcoding" para os animais, se tornando uma abordagem inovadora e eficaz para ser utilizada por especialistas ou não na identificação de espécies animais (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004a; Hebert *et al.*, 2004b).

O COI é uma proteína transmembrana composta por muitas subunidades de origem nucleares e três subunidades de origem mitocondrial I, II e III. Esta proteína é altamente conservada entre as espécies e desempenha a fosforilação oxidativa do metabolismo (Waugh, 2007). O barcoding dos animais compreende um fragmento de 648 pares de bases do gene COI, onde inserções e deleções são raras (Blaxter, 2004), além de oferecer vantagens do DNA mitocondrial, como herança predominantemente materna, baixo polimorfismo, ausência de recombinação gênica e baixas taxa de mutação. Este fragmento tem se mostrado eficiente em diferentes grupos taxonômicos de animais (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004a; Hebert *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Witt *et al.*, 2006).

O uso do DNA barcoding teve grande expressão a partir de 2004 com a criação do "Consortium for the Barcode of Life (CBOL)" que teve como objetivo criar um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene Cox1, onde é possível comparar com sequências já disponíveis e facilitar o processo de automação da identificação das espécies, através do site www.barcoding.si.edu, tornando assim acessível à comunidade científica.

Esta metodologia vem sendo empregada para identificar espécies de forma satisfatória, em espécimes em diferentes estágios do ciclo de vida, e ainda em casos de espécies crípticas (Waugh, 2007).

Pazian *et al.*, (2012) demonstraram por estudos através da técnica da investigação dos genes COI e Cyt B, integrados à citogenética molecular, que os

indivíduos das espécies *Piabina argentea* e *Piabina anhembi* do gênero *Piabina* (Ordem Characiformes), coletados nas bacias do Paranapanema e Tietê, apresentaram diferenças citogenéticas. Os espécimes da espécie *Piabina argentea* apresentaram distâncias genéticas significativas pela análise do DNA barcoding, levando a sugerir que se tratavam de três grupos distintos, ou seja, a distância genética apresentada sustentou a conclusão de que estas amostras são unidades taxonômicas distintas.

Silva *et al.,* (2014) confirmaram através da análise do DNA barcoding o monofiletismo existente entre as espécies de *Hipancistrus zebra* e *Hipancistrus debilitera* e, apesar da macroestrutura cariotípica demonstrar um padrão conservado para a tribo Ancistrini, as investigações em nível molecular revelam um caráter bastante dinâmico nas sequências de rDNA 18S e 5S, além da presença dos elementos transponíveis Rex-3 tanto em regiões eucromáticas quanto em regiões heterocromáticas, sugerindo que estes fatores em conjunto podem ser os responsáveis por esta grande variedade de colorações apresentada por estes peixes ornamentais.

Cardoso *et al.* (2015) analisando a espécie *Electrophorus electricus* encontraram variações cariotípica nos espécimes das três localidades pesquisadas na região amazônica, porém a análise do DNA barcoding demonstrou que as variações cariotípicas diferenciam somente populações, pois provavelmente ainda não houve tempo suficiente para o acúmulo de divergência do gene COI, para que estas populações possam ser consideradas espécies distintas.

No presente trabalho a metodologia do DNA barcoding vai ser utilizada como ferramenta para a investigação de espécies crípticas ou até mesmo novas espécies do gênero *Rhamphichthys*, pois o mesmo precisa passar por revisões taxonômicas, e em se tratando de Gymnotiformes, em que o número de novas espécies vem aumentando significativamente, esta técnica molecular pode ser uma grande aliada da citogenética, para identificá-las.

1.6. O DNA REPETITIVO COMO FERRAMENTA DE COMPREENSÃO DO GENOMA DOS PEIXES

Na maioria dos organismos, a região composta por DNA repetitivo corresponde uma fração considerável do genoma da espécie, podendo representar mais de 80% do seu tamanho e apresentar alta variabilidade. Esta característica também

implica em variação no tamanho do genoma das espécies, devido ao acúmulo destas sequências repetidas (Charlesworth *et al.*, 1994; Gregory, 2005; Plohl *et al.*, 2008).

O DNA repetitivo pode ser definido como segmentos de DNA que se repetem em milhares de vezes no genoma, podendo ter uma função definida, ou seja, uma sequência codificante, ou ainda como uma sequência de DNA não codificante, que se encontra dispersa no genoma ou repetida em *tandem* (Griffiths *et al.*, 2006). Entre as sequencias repetitivas codificantes podemos citar entre os mais estudados, que são as famílias multigênicas ribossomais do rDNA 45S, 18S e 5S. Já em relação aos repetitivos não codificantes, eles podem estar organizados em *tandem* no genoma, como o DNA satélite, os microssatélites, e os minissatélites ou ainda dispersos, como é o caso dos elementos transponíveis (Kedes, 1979; Flavel, 1986; Prokopowich *et al.*, 2003; Nagoda *et al.*, 2005).

Apesar do avanço das pesquisas, ainda não se sabe ao certo a função destes DNA repetitivos, porém costumam estar relacionados à organização estrutural e funcional do genoma, já que foi sugerido na literatura o envolvimento dessas sequências em eventos de recombinação (Biet *et al.*, 1999), de expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e também podem estar envolvida em eventos de rearranjos cromossômicos, como deleção, duplicação, translocação reciproca e inversões (Kidwell, 2002). Acredita-se também que estas sequências desempenham funções cruciais de manutenção e propagação do material genético nuclear, já que elas estão presentes nos segmentos de centrômeros e telômeros de cromossomos de eucariotos. Elas também são úteis nas investigações sobre a origem e evolução dos cromossomos sexuais e cromossomos B (Csink e Henikoff, 1998; Martins *et al.*, 2004; Mazzuchelli e Martins, 2009; Voltolin 2012).

Neste sentido, podemos verificar a presença dessas sequências repetidas em regiões heterocromáticas que estão nas regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos mitóticos, onde proteínas se ligam por afinidade a essas regiões orientando a movimentação cromossômica no ciclo celular (Csink e Henikoff, 1998). Entretanto, já foram observadas estas sequências também em regiões de eucromatina, mas parecem trazer prejuízos às regiões gênicas sendo, portanto, eliminadas por pressão seletiva (Deininger *et al.*, 2003).

Os DNAs satélites podem se apresentar de diferentes formas no genoma: as sequências de DNAs satélites apresentam em torno de 100 - 300 pares de bases, de natureza altamente repetitiva, que se encontra principalmente em regiões centroméricas

e teloméricas estas sequências são utilizadas para a investigação de rearranjos cromossômicos. Os minissatélites, também conhecidos como VNTR possuem de 10-60 pares de bases, e se classificam como sequências moderadamente repetitivas, como exemplo as regiões teloméricas, que costumam ser usadas em técnicas como a técnica de fingerprint, em mapeamentos genéticos e investigações de estudos de genética de populações. As sequências de microssatélites são pequenas regiões repetitivas, que costumam variar de 1-5 pares de bases, sendo altamente polimórficas e encontradas de forma dispersa nos genomas e geralmente são utilizadas com a finalidade de investigações forenses, criminais e de paternidade.

Devido às inúmeras investigações feitas a cerca destas sequências repetidas do DNA, Martins *et al.* (2006) propõem que a evolução do genoma espécies esteja relacionada à sua aquisição. Mas, que apesar do conhecimento de estrutura, função e composição dos cromossomos, e até mesmo após o conhecimento do genoma total das espécies, muitas questões ainda estão obscuras por não conseguirem ainda responder indagações, como sua posição exata devido os *"gaps"* em sequenciamentos, seus rearranjos e o número exato de cópias no genoma.

Apesar de estudos genéticos e citogenéticos moleculares relacionados a sequências repetitivas serem frequentes, as pesquisas relacionadas aos peixes neotropicais ainda são restritas diante do número de espécies existentes. Entretanto, com o advento da técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) permitiu que essas sequências sejam localizadas em núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos, propiciando o mapeamento físico de muitas destas sequências, que acabam por servir como marcadores populacionais, trazendo informações adicionais a diversidade e evolução da nossa ictiofauna (Mazzuchelli e Martins, 2009; Cioffi, 2011). As análises dessas sequencias repetitivas vem sendo muito utilizadas em grupos de peixes, já que estão auxiliando na identificação de homeologias cromossômicas, diversificação de cromossomos sexuais e origem de cromossomos B (Vicari *et al.*, 2010).

O mapeamento físico dos DNA ribossomais, em especial o rDNA 5S e 18S, que são sequências que codificam o RNA ribossômico dispostas em tandem, vêm sendo utilizadas com grande frequência por estudos citogenéticos de peixes neotropicais (Martins & Galleti, 1999; Souza *et al.*, 2001; Vicenti *et al.*, 2001; Almeida- Toledo *et al.*, 2002; Mantovanni *et al.*, 2005; Fernandes & Martins-Santos, 2006; Martins *et al.* 2006; Rosa *et al.*, 2006; Vicari *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2012; Mariotto *et al.*, 2011; Pansonato- Alves *et al.*,

2011; Nakajima *et al.*, 2012; Scacchetti *et al.*, 2012) por auxiliarem em esclarecimentos de problemas taxonômicos, biogeográficos e filogenéticos.

A utilização de sondas teloméricas com repetições em tandem em vertebrados (TTAGGG)n, também vem demonstrando grande importância, porque é capaz de detectar rearranjos cromossômicos, principalmente as fusões cêntricas recentes, com as indicações de marcações intersticiais teloméricas (ITS- Interstitial telomeric sequence) (Slijepcevic, 1998; Milhomem *et al.*, 2008).

Outra classe de DNA satélite que vem sendo explorada nos estudos evolutivos de peixes é o Bkm (Banded Krait Minor), que apresenta como principal componente de repetição o tetranucleotídeo (GATA)n, foi descrito primeiramente por Epplen *et al.* (1988) e parece estar relacionado a determinação e evolução dos cromossomos sexuais.

Mestriner *et al.,* (2000) identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma de *A. scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51pb, denominado As51. Eles demonstraram por FISH que este DNA repetitivo estava presente, principalmente, em regiões de heterocromatina distais, em algumas NORs (regiões organizadoras de nucléolo) e também no isocromossomos B da espécie. A análise desses resultados demonstrou a natureza intraespecífica do cromossomos B e também que a região do DNA satélite As51 passou por amplificações em ambos os braços do isocromossso B.

Em se tratando de DNA repetitivo disperso, em sua maioria são formados por elementos transponíveis (TEs), que têm a capacidade de mover de um local para o outro dentro do genoma. A Subclasse I (Retrotransposons) se utiliza da enzima transcriptase reversa para operar seu mecanismo de transferência replicativo (“copia e cola”), presente no RNA intermediário. Já a subclasse II, se utiliza da enzima transposase, que por sua vez está ausente no RNA intermediário, e utiliza como mecanismo de transferência a autoduplicação (‘recorta e cola”) (Sczepanski, 2008; Kidwell, 2002).

No genoma de peixes, já foram relatados a presença de transposons e retrotransposons. Muitos deles também são encontrados em anfíbios e alguns invertebrados, provavelmente adquiridos por transferência horizontal, existindo relato de pelo menos 12 classes de retrotransposons que foram identificados em peixes e também em anfíbios. As espécies *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis* que são espécies modelos apresentam de 3 a 4% do seu genoma representado por transposons (Aparicio *et al.*, 2002; Volff *et al.*, 2003; Jaillon *et al.*, 2004).

Os elementos transponíveis que vem sendo bastante utilizado nas pesquisas de genética de peixes são os retroelementos que compõem a família dos REX, sendo eles

REX1, REX 3 e REX6, que geralmente são encontrados de maneira dispersa ao longo do cromossomo, mas também é frequentemente encontrado uma maior concentração dos elementos REX 1 e REX 3, em regiões centroméricas, pericentroméricas e também nas regiões de blocos de heterocromáticos (Ribeiro, 2013; Schineider *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

Entretanto, Blanco (2012) relata que em suas análises com os retroelementos da família REX em sete espécies de loricarídeos do gênero *Harttia,* apesar de estarem dispersos ao longo dos cromossomos como costumam ser encontrados, ocorrem tanto em regiões eucromáticas quanto em heterocromáticas, demonstrando que neste caso eles não devem estar relacionados aos rearranjos cromossômicos, mas sim com atividades de regulação gênica.

Em Characifomes, Borba (2013) investigou a ocorrência dos retroelementos da família REX em seis espécies do gênero *Leporinus*, não sendo identificado, em nenhuma destas espécies, o elemento REX6. A Análise FISH usando REX1 detectou diferentes padrões de distribuição em *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, e *L. Obtusidens*, onde estes elementos se encontraram mais concentrados nas regiões terminais, e dispersos nas outras duas espécies. Além disso, foram detectados sinais intersticiais de REX 1 e 3 no cromossomo W destas três espécies já citadas, sugerindo que estes elementos transponíveis surgiram provavelmente em diferentes momentos durante a evolução destas espécies. Também foi relatado por Yano *et al.*, (2014) a presença de sinais de hibridização de REX 3 co –localizadas com o DNAr 5s no cromossomo 27, enquanto os Rex1 e 6, distribuiram-se de maneira dispersa e diferente do que já relatado em literatura que envolvam a temática de cromosomos sexuais, nenhuma destas sequências parecem compor o neo –Y de *Erythrinus erythrinus*.

Neste trabalho, a investigação das sequencias repetidas DNA satélite rDNA 5S e 18S, e destes retroelementos REX 1 e REX3 foram realizados com objetivo de melhor caracterizar as espécies crípticas do gênero *Rhamphichthys*, que possibilitará um melhor entendimento da composição genômica dos cromossomos B que estas espécies apresentam. Esta é uma investigação pioneira para a família Rhamphichthyidae, que até o momento apresenta somente três espécies cariotipadas das oito que compõem a família.

OBJETIVOS

1.7. GERAL

Caracterizar o cariótipo do gênero *Rhamphichthys* de duas populações da bacia Amazônica, almejando compreender os mecanismos de evolução cromossômica que atuaram na diversificação das espécies, compreender a possível origem e composição do cromossomo B, e através da investigação das sequências repetitivas de DNA diagnosticar a diversidade genômica e possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos neste evento, auxiliando na possível elucidação de problemas taxonômicos do grupo.

1.8. ESPECÍFICOS

a) Caracterizar através da citogenética clássica e molecular as espécies da família Rhamphichthyidae de diferentes populações da Bacia Amazônica.
b) Fornecer dados cariotípicos que possam auxiliar no esclarecimento da diferenciação e evolução cromossômicas dessas espécies, contribuindo também para um melhor entendimento das relações de parentescos desse grupo.
c) Fazer uma análise comparativa intra e interespecífica entre as populações através das características do cariótipo, assim como por distribuição das bandas e identificar possíveis rearranjos cromossômicos.
d) Utilizar o DNA Barcoding como uma ferramenta da biologia molecular para diferenciar indivíduos identificados como mesma espécie.
e) Utilizar a técnica de FISH (Hibridização *In Situ* Fluorescente), com sequências repetitivas de DNA, para que possamos identificar a possível composição genômica do cromossomo B, e comparar as similaridades entre genomas de espécies diferentes.

3. CAPÍTULO I:

INTEGRAÇÃO DA CITOGENÉTICA COM DNA BARCODING IDENTIFICA OCORRÊNCIA DE NOVOS CITÓTIPOS EM RHAMPHICHTHYS (GYMNOTIFORMES).

Patrícia Corrêa da Silva[1, 4], Cleusa Yoshiko Nagamachi [1,2] Jonathan Stuart Ready[1,3], Wilsea Maria B. Figueiredo-Ready[1,3], Ana Claudia Guimarães Rocha[1,5], Julio Cesar Pieczarka[1,2].

[1]Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Av Perimetral, SN. Guamá. 66075-900. Belém, Para, Brazil. [2]CNPq Pesquisador(a), Belém, Brazil. [3] Pesquisador(a) Instituto Estudos Costeiros –Bragança, UFPA [4] Bolsista CNPq Programa de Genética e Biologia Molecular. [5] Bolsista de Mestrado do Institutos de Estudos Costeiros UFPA-Bragança.

Autor correspondente Julio Cesar Pieczarka (juliopieczarka@gmail.com)

Resumo

O gênero *Rhamphichthys* (Gymnotiformes) é encontrado em maior abundância e diversidade na Bacia Amazônica, apesar de estar presente em toda a região Neotropical. Ainda há incerteza sobre o status taxonômico de muitas espécies e populações, devido à sua relativa raridade em coleções, bem como sua similaridade morfológica, demonstrando a necessidade de mais ferramentas para o auxilio na identificação de novas espécies. Os espécimes aqui investigados foram coletados na Bacia Amazônica, no Rio Guamá (Belém e Barcarena), Rio Caripetuba e Rio Anequara (Abaetetuba) e depositados na coleção do Museu Paraense Emílio Goeldi. A análise de DNA Barcoding permitiu identificar os limites entre as espécies e a relação de parentescos e similaridades das amostras. Este resultado é confirmado pela análise citogenética, pois foram encontrados dois novos cariótipos, com fórmulas cariotípicas diversas. Dentre os citótipos encontrados, um dos cariótipos apresentou ainda cromossomos B, com número variável de 5 a 10 cromossomos, o que diferencia ainda mais os cariótipos das espécies. A integração dos dados citogenéticos com os de DNA Barcoding foi importante para a confirmação dos novos taxa e para o entendimento da evolução filogenética do gênero.

Palavras – chaves: Citogenética, Cromossomo B, *Rhamphichthys*, DNA Barcoding.

Introdução

A família *Rhamphichthyidae* (Gymnotiformes) tem sido objeto de estudo principalmente em trabalhos de filogenia, apesar de ser taxonomicamente pouco conhecida (Alves-Gomes 1998, Albert 2001, Albert & Crampton 2005). O gênero *Rhamphichthys* tem como características morfológicas um corpo longo, maior que 50 centímetros de comprimento e em torno de 300 raios em sua nadadeira anal, com relativa raridade em coleções, tendo sido descritas quatro novas espécies nos últimos anos (Triques 1999, Carvalho and Albert 2015). Ainda há incerteza sobre o status taxonômico de muitos taxa, o que é parcialmente resultado da similaridade morfológica entre as espécies em termos de padrão de cor e habitat (Reis, 2003). Isso é problemático, pois o gênero, no momento, apresenta um número subestimado de espécies, já que estes peixes apresentam baixa densidade amostral e em analises taxonômicas é possível que a variação ontogenética confunda as analises morfológicas (Crampton, 2011; Crampton *et al.*, 2005; Albert & Crampton, 2003; Alves-Gomes, 1998). Estes dados reforçam a demonstram a necessidade de outras ferramentas além da morfologia para a identificação de novas espécies, sendo importante uma revisão taxonômica para o grupo (Campos-da-Paz and Paepke 1994, Albert and Crampton 2005, Milhomem et al, 2008, Carvalho and Albert 2015). Porém o gênero apresenta poucos estudos em relação a marcadores alternativos à morfologia, pois apenas três espécies foram analisadas citogeneticamente (Mendes et. *al* 2012; Silva et. *al* 2013) e nenhuma foi estudada por DNA Barcoding. Neste trabalho obtivemos dados citogenéticos e DNA Barcoding para espécies do gênero *Rhamphychthys*. Os resultados demonstram que na região Amazônica existe um novo citótipo para a espécie classificada como *Rhamphichthys rostratus.* Este novo citótipo apresentou variação do número de cromossomos B, nova fórmula cariotípica, além da diferenciação de marcadores citogenéticos clássicos e moleculares. A existência de mais de uma espécie também foi confirmada na árvore gerada pelo DNA Barcoding.

Material e Métodos

Os espécimes de *Rhamphichthys* foram coletados na Bacia Amazônica, nos rios Guamá (Belém) Arienga (Barcarena), Caripetuba e Anequara (Abaetetuba), tendo

seus representantes depositados na coleção do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) (Tabela 1, Figura 1). Os exemplares foram classificados por Carlos David Canabarro Machado de Santana, MPEG.

O DNA foi extraído, amplificado e sequenciado em ambas as direções seguindo o protocolo padrão CBOL com adaptações para tornar as reações mais eficientes para os Gymnotiformes (Figura 2). A árvore bayesiana gerada foi confrontada como os dados citogenéticos obtidos das espécies em estudo. As novas sequências foram adicionadas ao Barcoding of Life Database (BOLD). Foi também incluída na análise a espécie *Rhamphichthys marmoratus* de Mamirauá, AM, cujo cariótipo descrevemos previamente (Silva *et al.,* 2013). Entretanto, segundo dados morfológicos proposto por Carvalho *et al.,* 2015) estes espécimes são classificados como *Rhamphichthys* sp. As sequências de DNA Barcoding das espécies *Brachypopomus* sp (Jauaru) e *Rhamphichthys hanni* (Rio Paraná) foram obtidas no GenBank. As sequências foram alinhadas através do software Genious V6.01, sendo a espécies *Brachypopomus* sp utilizada como grupo externo.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, utilizando o protocolo descrito por Bertollo *et al*. (1978). Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980) e heterocromatina constitutiva (Banda C) foi detectada pela técnica descrita por Sumner (1972).

Resultados

Análise Citogenética

A espécie *Rhamphichthys rostratus* (Figura 2a) já caracterizada por Silva et *al*. (2013) apresenta 2n = 50 e fórmula cariotípica 42m/sm+8st/a. As demais amostras apresentaram 2n= 50 variando de acordo com a localidade o número de cromossomos B: amostra do Rio Guamá (Belém) apresentou como fórmula cariotípica 48m/sm+2st/a, com 5-6 cromossomos B (tendo a maioria 6), dos rios Anequara e Caripetuba 48m/sm+2st/a com 0-8 cromossomos B (tendo a maioria 8), e do Município de Barcarena 48m/sm+2st/a, com 6-10 cromossomos B (tendo a maioria 10). Os detalhes sobre o cariótipo e a quantidade de cromossomos B de cada exemplar estão na Tabela 1. As amostras que apresentam cromossomos B tiveram

distribuição distinta de heterocromatina quando comparada com os exemplares sem cromossomos B. A maioria dos cromossomos apresenta heterocromatina pericentromérica (Figura 2b), mas os portadores de cromossomos B também possuem braços cromossômicos heterocromáticos, como o braço longo do par 3 e o braço curto do par 18. Ambos os cariótipos apresentam o par 12 como o portador da região organizadora de nucléolo, e a sonda de rDNA 18S com marcação coincidente com o par da NOR (Figura 3a). Não foram evidenciadas marcações intersticiais com a sonda telomérica. Suas marcações foram visualizadas nas extremidades de todos os cromossomos de ambas as espécies, e também foram percebidas em todos os cromossomos B, sugerindo que eles já são estáveis no ciclo celular dos indivíduos portadores do novo citótipo (Figura 3b). Os exemplares analisados de *Rhamphichthys marmoratus* apresentam 2n = 50 cromossomos estando em evidência o par 23, que é o portador da NOR, e o par três com o braço longo heterocromático, enquanto que nos demais cromossomos a heterocromatina constitutiva se encontra distribuída na regiões pericentroméricas (Figura 4).

A análise do DNA Barcoding

Além de sequências disponíveis de *R. hahni* no GenBank, essas novas amostras da Amazônia indicam pelo menos três linhagens bastante distintas (> 3% de divergência de pares entre as linhagens mais similares). As linhagens com maior semelhança foram morfologicamente identificadas como *R. rostratus*. Uma terceira linhagem, morfologicamente identificada como *Rhamphichthys marmoratus*, apresenta maior divergência (por pares > 8%). Por sua vez, as investigações morfológicas das amostras permitiram identificar caracteres diagnósticos claros para diferenciar estas linhagens. A análise com o DNA Barcoding revelou que o grupo de exemplares que apresentavam os cromossomos B se agrupavam em um ramo da árvore gerada distinto dos demais (Figura 5), sendo então identificados como uma outra espécie. Existe ainda pelo menos mais uma espécie distinta, já que a amostra coletada em Mamirauá, previamente analisada por Silva *et al.* (2013), apresentara maior similaridade em seu barcoding com a espécie *R. hanni* , analisada por Mendes *et al.*, (2012) (Figura 6).

Discussão

A amostra do presente artigo foi composta por exemplares da espécie *Rhamphichthys rostratus* coletadas nos rios Guamá (Belém) Arienga (Barcarena), Caripetuba e Anequara (Abaetetuba). Em estudo realizando anteriormente (Silva et al., 2013), analisamos exemplares de *Rhamphichthys rostratus* coletados em Almeirim, distantes 400 quilômetros da presente amostra. Naquele estudo encontramos um carióripo com 2n=50, sendo 42m/sm+8st/a, sem cromossomos B. No presente estudo encontramos exemplares com este cariótipo no Rio Caripetuba (Abaetetuba). Todavia, a maior parte da amostra deste rio e toda a amostra dos outros rios mostrou um cariótipo diferente, com 48m/sm+2st/a e presença de números variáveis de cromossomos B, tanto entre os exemplares, bem como intraindividualmente (Tabela 1). Possivelmente esta diferença na morfologia dos pares cromossômicos é decorrente de inversões pericêntricas. No Rio Caripetuba (Abaetetuba), observou-se a simpatria de exemplares de *Rhamphichthys rostratus* com ambos os cariótipos. Este resultado sugere fortemente que tratam-se de espécies diferentes. Na análise da árvore Bayesina (Figura 5), *Rhamphichthys marmoratus* de Abaetetuba-Pará é grupo irmão das espécies que apresentam o cromossomo B (Belém-Barcarena-Abaetetuba), o que confirma sua condição de espécie distinta. Apesar de *R. marmoratus*, *R. hanni* e *R. rostratus* apresentarem todos o mesmo número diploide, *Rhamphichithys* sp., coletado em Mamirauá, no estado do Amazonas, e *R. hanni* proveniente da bacia do Paraná estão mais estreitamente relacionadas, pois apresentam o 2n=50 e diferenças citogenéticas em relação suas fórmulas cariotípicas, a distribuição da heterocromatina e o par portador da NOR, e mais distantes de *Rhamphichthys rostratus* que apresentam o cromossomo B (Figura 5). Estas similaridades que foram confirmadas, tanto por citogenética, quanto por DNA barcoding pode está relacionadas com questões biogeográficas do grupo, já que na literatura encontramos conexões entre os rios da Amazônia Oriental e o Pantanal, que poderia justificar estas semelhanças genéticas entre as espécies de *Rhamphychithys* sp. e *R. hanni*.

Como já foi demonstrado através de estudos comparativos de mapeamento citogenético por Nagamachi *et al.* (2010), Milhomem *et al*. (2008), Milhomem *et al.*

(2012) vários rearranjos cromossômicos ocorridos durante a história evolutiva, como fissão/fusão em tandem, translocações, inversões, diferenciaram taxa e estas diferenças permitiram identificar complexos de espécies crípticas do gênero *Gymnotus.* Espécies com cariótipos quase idênticos por citogenética clássica haviam sofrido uma quantidade considerável de rearranjos sendo na realidade bastante diferentes. Assim, será importante no futuro verificar por pintura cromossômica se os espécimes de *R. rostratus* com e sem cromossomos B apresentam rearranjos que causem problemas meióticos, constituindo barreira reprodutiva. Além disso, Silva et *al*. (2014) demonstrou por citogenética clássica, molecular e DNA Barcoding a existência de duas espécies distintas em *Hypancistrus*, apesar de possuírem o mesmo número diploide 2n=52, considerado uma sinapomorfia do grupo.

Um aspecto interessante dos presentes resultados é a presença de cromossomos B na amostra da região Belém-Barcarena-Abaetetuba. Estudos anteriores tem demonstrado que a presença de cromossomos B pode estar relacionada à poluição ambiental, como observado em plantas (Kwasniewska & Mikolajczyk, 2014), moluscos (Leitão et al., 2008) e roedores (Borisov, 2008). No estudo anterior (Silva et al., 2013) coletamos amostras de *R. rostratus* de Almeirim e *R. marmoratus* da Reserva ecológica Mamirauá, sendo ambas as localidades livres de poluição ambiental. No entanto a região onde foi coletada a amostra do presente trabalho está muito degradada ambientalmente. Belém é uma metrópole com quase 2 milhões de habitantes e Barcarena e Abaetetuba estão próximas a áreas de mineração de bauxita e indústrias de alumínio, ocorrendo derramamento de substâncias químicas com frequência. Em um estudo utilizando também Gymnotiformes foi demonstrado que a quantidade de micronúcleos e alterações nucleares era nitidamente maior em Abaetetuba quando comparada com Mamirauá (Melo et al., 2013). Estudos anteriores sugerem que *Rhamphichthys* é sensível às variações ambientais, podendo ser utilizado como bioindicadores de poluição (Melo *et al*., 2013) Assim sugerimos que os exemplares de Belém-Barcarena-Abaetetuba diferenciaram-se em uma nova espécie, acumulando rearranjos que alteraram seus cariótipos.

Agradecimentos

Ao Carlos David Canabarro Machado de Santana pela identificação das amostras ao Museu Paraense Emílio Goeldi pelo tombamento dos peixes em sua coleção. Ao Ibama pela licença e Capes e CNPq pelo financiamento do projeto de doutorado.

Referências

Albert, JS and Crampton, WGR (2005) Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). Pp. 360-409. In: Bullock, T.H, Hopkins, C.D; Popper, A.N & Fay, R.R. (Eds.). Electroreception.v 21. New York, Springer Handbook of Auditory Research, p 485.

Bertollo LAC, Takashi CS, Moreira- Filho O (1978) Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pices, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics 1(2):103-120.

Böhne, A; Brunet, F; Galiana-Arnoux, D; Schultheis, C; Volff, JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.

Borisenko, AV, Lim BK, Ivanova, NV, Hebert PDN (2008) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. Molecular ecology resources 8, 471-479.

Borisov, YM. (2008). Increase in the number of the B-chromosomes and variants of their system in mouse *Apodemus peninsulae* in Mountain Altai population over 26 years. Russian Journal of Genetics 44:1070-1079.

Burt, A; Trivers, R. (2006) Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Cambridge: *Harvard University Press*, p. 228-300.

Campos-da-Paz, R., and Paepke, HJ (1994) On *Sternarchorhamphus hahni* a member of the *Rhamphichthyid* genus *Rhamphichthys* (Ostariophysi: Gymnotiformes). Ichthyological Exploration of Freshwaters 5:115-159.

Carvalho, TP and Albert, JS (2015) A new species of *Rhamphichthys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) from the Amazon Basin. Copeia: 103, nº 1, 34-41.

Clare EL, Lim BK, Fenton MB, Hebert PDN (2011) Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodings. PLoS ONE 6(7): e22648. doi:10.1371/journal.pone.0022648.

Costa, R. M. A.; Menk, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia: *Ciência & Desenvolvimento*, 12: 24-26.

Crampton, WGR (2011) An ecological perspective on diversity and distributions. In: Albert JS, Reis RE. Historical Biogeography of Neotropical freshwater Fishes.University of California Press, PP.165-189.

Fernandes, TCC (2005) Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando Allium cepa e Oreochromis niloticus como sistemas-testes. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

Ferreira, IA; Martins, C (2008) Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. Micron, 39: 411-418.

Hebert, PDN., Stoeckle, MY., Zemlak, TS., Francis, CM. (2004a) Identification of birds through DNA Barcodings. PLoS Biol, 2(10):1567-1663.

Hebert, PDN, Penton, EH, Burns, JM., Janzen, DH., Hallwachs, W. (2004b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. Proc Natl Acad Sci USA, 101(41):14812-14817.

Hebert PDN, Cywinska, A, SL Ball & JR. de Waard (2003a) Biological identifications through DNA Barcodings.Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 270: S569-S599.

Hebert, PDN, Ratnasingham, S, de Waard, JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci, 270:S96-99.

Hogg, ID & Hebert, PDN (2004) Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA Barcodings. Canadian Journal of Zoology 82, 749–754.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. A 1 step method. Experientia 36:1014-1015.

Hubert, N, Hanner, R., Holm, E, Mandrak, NE, Taylor, E, et al. (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodings. PLoS ONE 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490

King, M (1993) Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge: University Press.

Kwasniewska, J & Mikolajczyk, A (2014) Influence of the Presence of B Chromosomes on DNA Damage in Crepis capillaris. Plos One 9(1): e87337. doi:10.1371/journal.pone.0087337.

Leitão A., Chaves, R., Joaquim, S., Matias, D., Ruano F., Guedes-Pinto, H (2008) Supernumerary chromosomes on Southern European populations of the cockle

Cerastoderma edule: Consequence of environmental pollution?Estuarine, Coastal and Shelf Science 79 (1):152-156.

Melo K.M., Alves I.R., Pieczarka, J. C., David J.A.O., Nagamachi, C. Y. & Grisolia C. K. (2013) Profile of micronucleus frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon. Genetics and Molecular Biology 36 (3): 425-429.

Mendes VP, Portela-Castro AL, Júlio-Junior HF (2012) First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. Comparative Cytogenetics 6: 1-16.

Milhomem, SSR., Pieczarka, JC., Crampton, WGR., Silva, DS., De Souza, AC P,Carvalho, JR. & Nagamachi, CY (2008) Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the Gymnotus carapo species-complex (Gymnotiformes, Gymnoti-dae).BMC Genetics 9, 75.doi: 10.1186/1471-2156-9-75.

Minissi, S.; Lombi, E. (1997) Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, v. 39, p. 317-321.

Nagamachi, CY., Pieczarka, JC., Milhomem, SSR., O'Brien, PCM., de Souza, ACP & Ferguson-Smith, MA. (2010). Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, Gymnotus carapo (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. BMC Genetics 11, 28.doi: 10.1186/1471-2156-11-28.

Obiakor M. O.; Okonkwo J. C.; Nnabude P. C.; Ezeonyejiaku C. D. 2012. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *J Anim Sci Adv*, 2(1): 123-133.

Pascalicchio, AE (2002) Contaminação por metais pesados. *Ed. Annablume*, São Paulo, 132pp.

Pegg, GG., Sinclair, B, Briskey, L., Aspden,WJ., (2006) MtDNA Barcoding identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. Scientia Marina 70 (Suppl. 2), 7–12.

Primack, R. 2006. Essentials of Conservation Biology. 4th Edition, Sinauer Associates, p. 585.

Primack, R. 2008. A Primer of Conservation Biology. 4th Edition, Sinauer Associates, p. 300.

Reis, RE., Kullander, SO., Ferrarri –Jr, CJ (2003) Check list of the freshwhater fishes of South and Central America. Porto Alegre. Edipucrs 742p.

Ribeiro, LR.; Salvadori, DMF.; Marques, EK (2003) Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA. Canoas-RS. p. 356.

Ridley, M (2006) Evolução. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 752pp.

Schneider, CH; Gross, MC; Terencio, ML.; Artoni, RF; Vicari, MR.; Martins, C; Feldberg, E (2013 a) Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. Reviews in Fish Biology and Fisheries.

Silva, Maelin., Ribeiro, ED, Matoso, DA, Souza, LM, Hrbek, T., Py-Daniel, RL., Feldberg, E. (2014) Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. Genetica 142, 127-139.

Silva PC, Nagamachi CY, Silva DS, Milhomem SSR, Cardoso AL, Oliveira JA, Pieczarka JC (2013) Karyotypic similarities between two species of *Rhamphichthys* (Rhamphichthyidae, Gymnotiformes) from the Amazon basin. Comparative Citogenetics doi: 10.3897/CompCytogen.@@.4366.

Smith, MA, Fisher, BL & Hebert, PDN (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar.Philosophical Transactions of the Royal Society B 360, 1825–1834.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75:304-306.

Tagliacollo VA, Bernt MJ, Craig JM, Oliveira C , Albert JS (2016) Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 95 (2016) 20–33.

Valdez-Moreno, M., Ivanova, NV, Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S. and Hebert,PDN (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA Barcodings. Journal of Fish Biology 74, 377–402.

Varriale, A; Torelli, G; Bernardi, G (2008) Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA*, 14: 1492-1500.

Victor, BC (2007) Coryphopterus kuna, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. Zootaxa 1526, 51–61.

Volff J.N., Bouneau L., Ozouf-Costaz C., Fischer C. (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. Trends in Genetics. v19, n12, p 674-678.

Ward, RD, Zemlak, TS, Innes, BH, Last, PR., Hebert, PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 359:1847-1857.

FIGURAS E TABELAS:

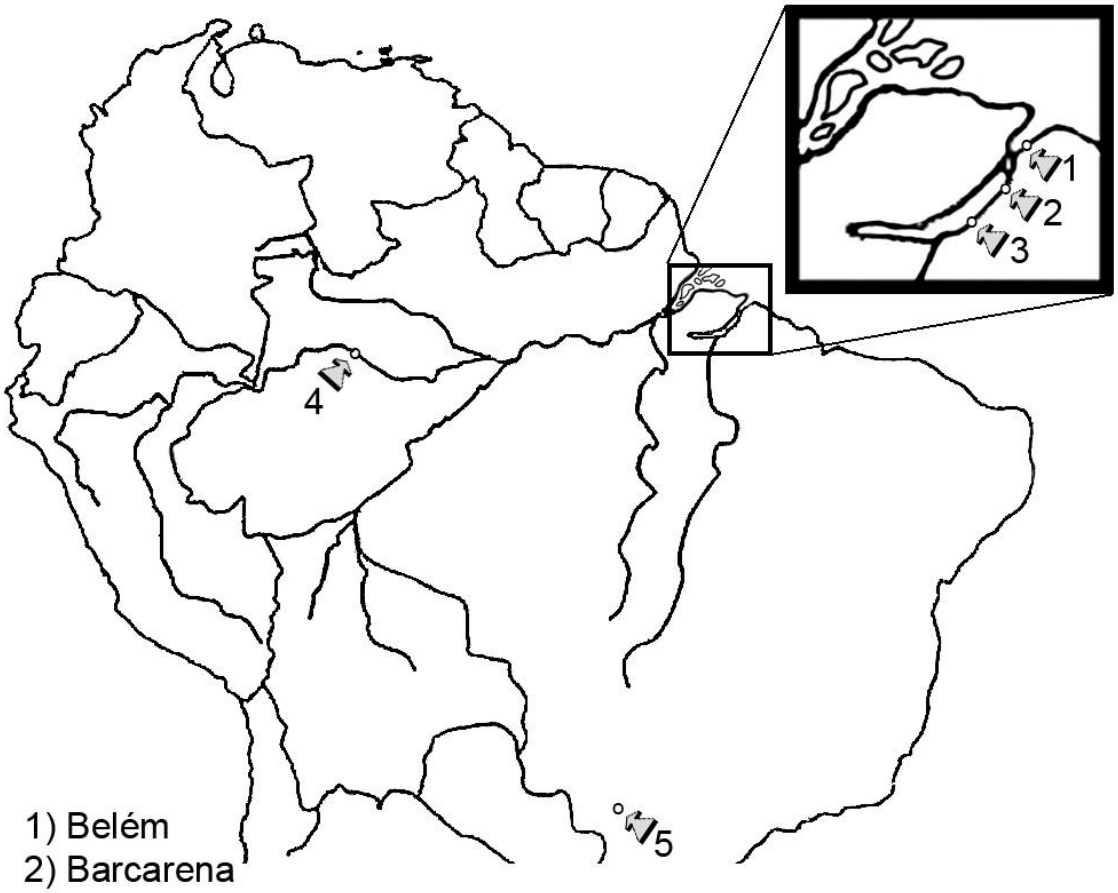

Figura 1: Mapa de localização das amostras de *Rhamphichthys* e do grupo externo (*Brachyhypopomus*sp) as redes hidrográficas definidas pelas linhas azuis e áreas de baixa altitude (gradiente de elevação entre 0m acima do nível do mar (preto) e ≥ 300m acima do nível do mar (branco).

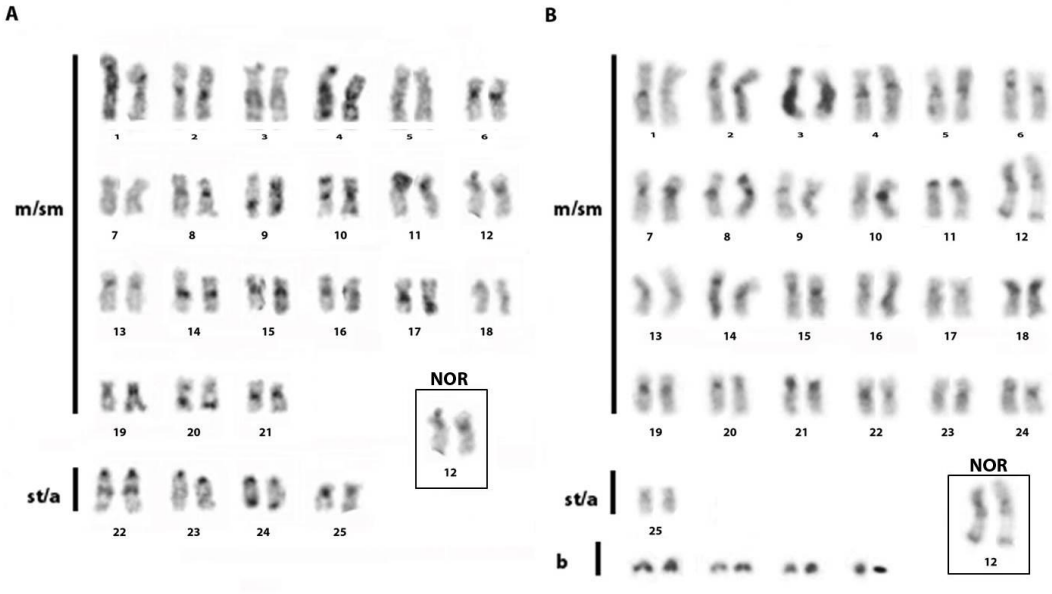

Figura 2: A) Cariótipo da espécie *Rhampchithys rostratus* com 2n = 50 (FK= 42m/sm+8st/a) B)Cariótipo de *R. rostratus* que apresentam o novo citótipo 2n = 50+8 B's (FK= 48m/sm+2st/a+8B's), ambos cariótipos demonstrando a distribuição da heterocromatina constitutiva através do bandeamento C, em destaque o par da NOR, diferenciando os cariótipos.

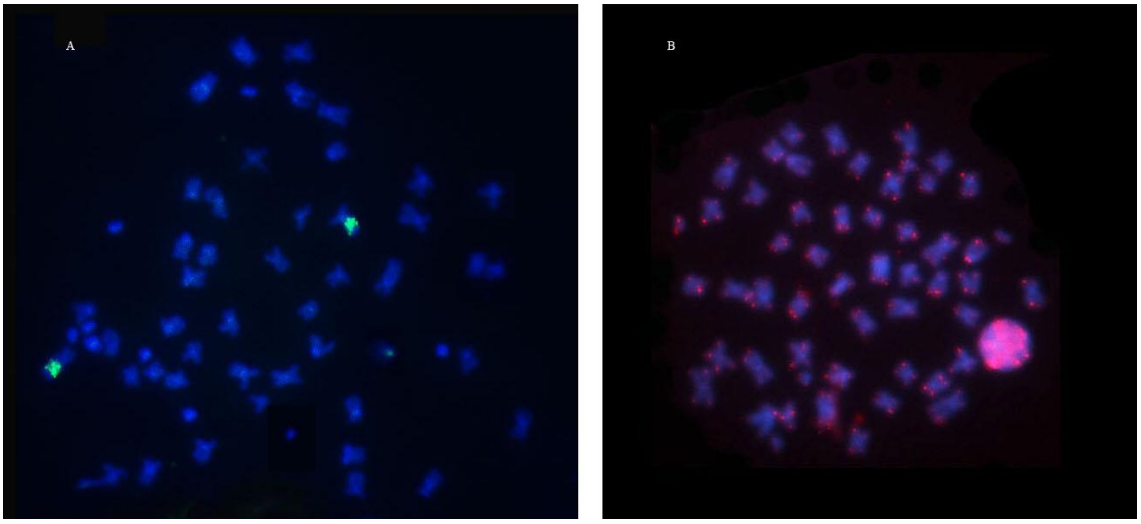

Figura 3: FISH realizado na espécie *R. rostratus*, novo citótipo. A) Localização física da sonda rDNA18S que se apresenta coincidente com a NOR. B) Marcação da sonda telomérica, não sendo vista nenhum sinal de marcações intersticiais.

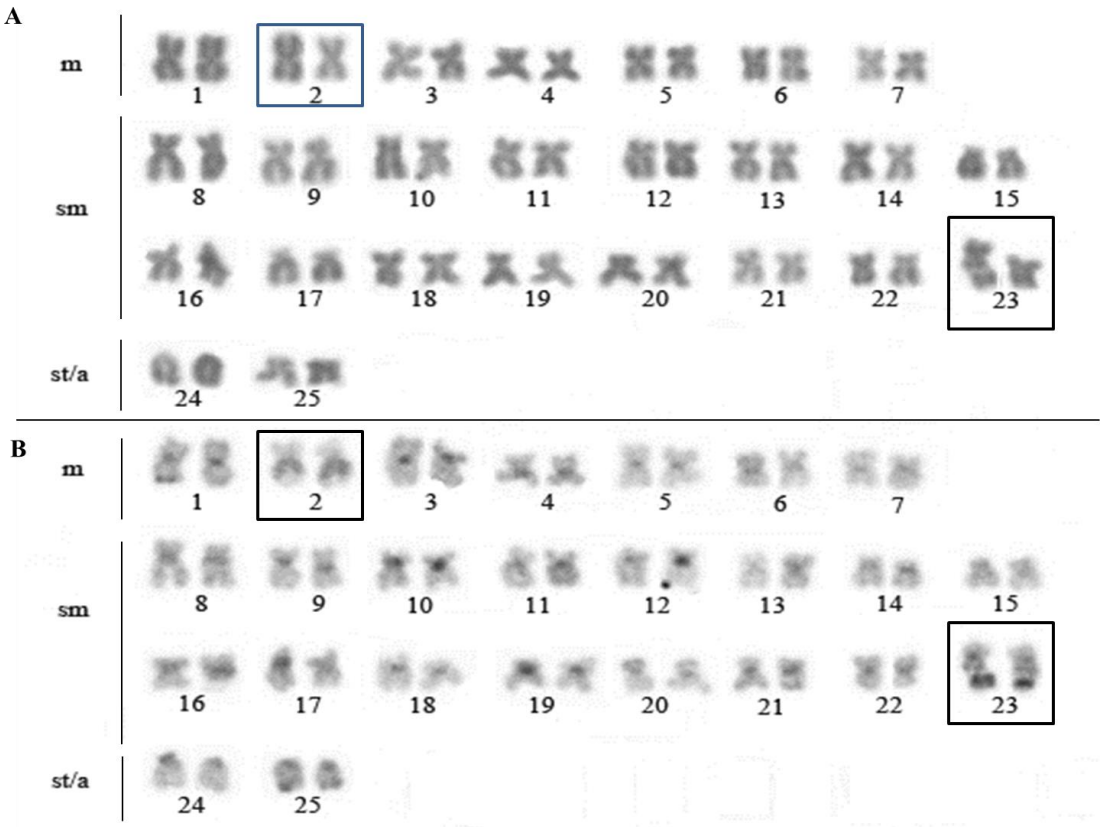

Figura 4: A) Cariótipo convencional de *Rhamphichthys marmoratus*, corado com Giemsa, com destaque para o par portador da NOR. B) Cariótipo em banda C com destaque para o par 2, com evidente bloco heterocromático, e o par 23 portador da NOR.

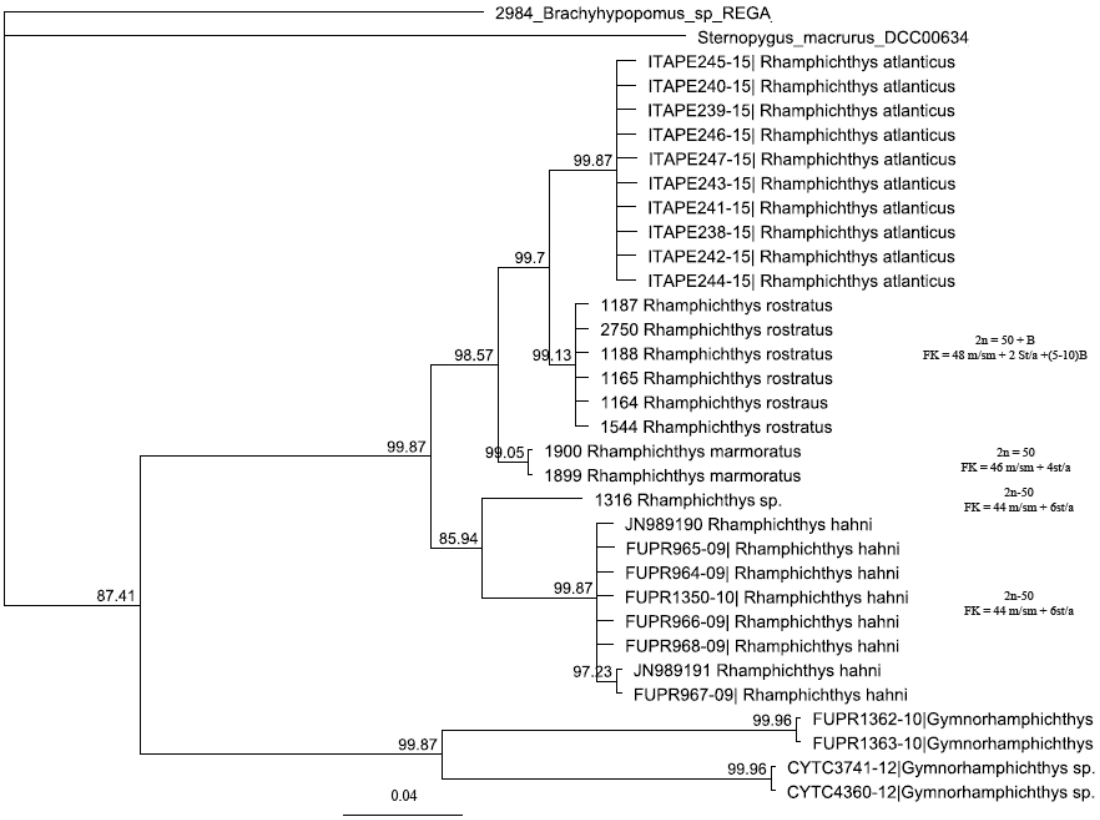

Figura 5: Árvore Bayesina para amostras de *Rhamphichthys*, com *Brachyhypopomus* sp. utilizado como grupo externo, com suporte em 1000 pseudoréplicas. Diferenciam em termos das espécies as amostras que apresentam o cromossomo B, e os *Rhamphichthys* sp.

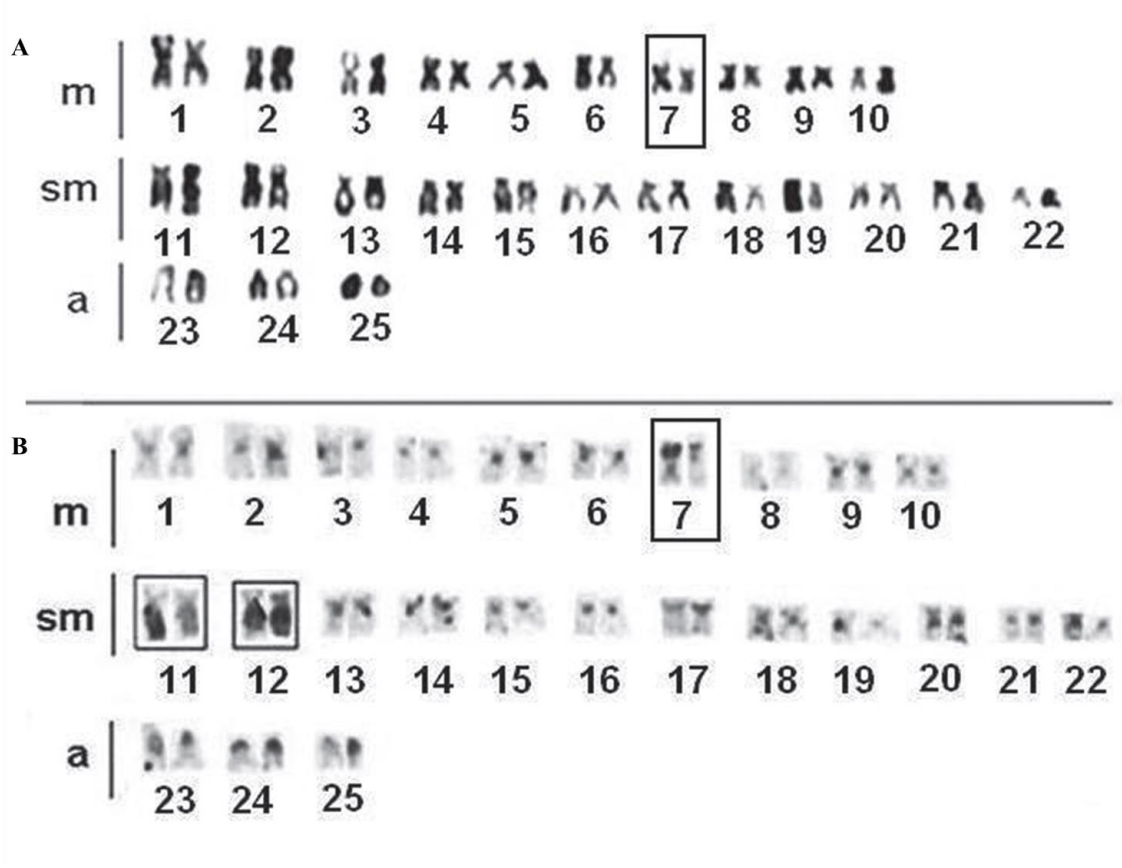

Figura 6: A) Cariótipo convencional de *Rhamphichthys hanni*, corado com Giemsa, com destaque para o par 7, portador da NOR. B) Cariótipo em banda C com destaque para o par 11 e 12, com evidente bloco heterocromático, e o par 7 portador da NOR. Dados de Mendes *et al.* (2012).

Tabela 1: Amostras analisadas no presente trabalho.

Localidades	Rio	Exemplares	Cariótipo	Cromossomos B
Abaetetuba	Anequara 01°40'42.6"S, 049°00'16.6"W	P1180(Fêmea)	48m/sm+2st/a	8
		P1181(Fêmea)	48m/sm+2st/a	8
		P1187(Macho)	48m/sm+2st/a	7-8
		P1188(Fêmea)	48m/sm+2st/a	8
	Caripetuba 01°37'23,49"S 048°55'33"W	P1285(Macho)	42m/sm+8st/a	0
		P1286(Fêmea)	42m/sm+8st/a	0
		P1899(Macho)	42m/sm+8st/a	0
		P1294(Macho)	48m/sm+2st/a	5-8
		P1900(Macho)	48m/sm+2st/a	7-8
		P2749(Macho)	48m/sm+2st/a	8
		P2757(Fêmea)	48m/sm+2st/a	7-8
		P2758(Fêmea)	48m/sm+2st/a	8
		P2759(Macho)	48m/sm+2st/a	8
		P2764(Macho)	48m/sm+2st/a	8
		P3070(Macho)	48m/sm+2st/a	8
Belém	Guamá 01°28'33.88"S 048°27'08.73"W	P1164(Fêmea)	48m/sm+2st/a	6
		P1165(Macho)	48m/sm+2st/a	6
		P1190(Macho)	48m/sm+2st/a	5-6
Barcarena	Arienga 1º34’25.36”S 48º45’55.21”W	P1541(Fêmea)	48m/sm+2st/a	8-10
		P1543(Fêmea)	48m/sm+2st/a	6-10
		P1544(Fêmea)	48m/sm+2st/a	9-10
		P1545(Macho)	48m/sm+2st/a	10
		P1546(Macho)	48m/sm+2st/a	9-10
		P1547(Fêmea)	48m/sm+2st/a	10

Material Suplementar

Comparação dos dados morfométricos apresentados pelos espécimes do gênero Rhamphichithys, coletados no Rio Caripetuba, Abaetetuba – Pará.

Fórmulas Cariotípicas	Sem cromossomo B 42m/sm+8st/a,		Com cromossomo B 48m/sm+2st/a + (5-10 B)			
Exemplares	1899(Sexo não identificado)	1900(Fêmea)	1187(Macho)	1188(Fêmea)	1544(Macho)	2750(Macho)
SL	399.2	356.61	458.12	516.24	405,78	481.68
AFL	361.62	326.29	399.62	468.84	355.30	434.90
PAFL	37.58	30.32	58.50	47.40	50.48	46.78
BD	44.66	28.70	43.82	42.18	39.34	45.52
PFL	22.30	17.26	23.08	20.0	19.80	20.78
HL	57.08	46.30	73.46	75.10	70.58	72.36
CFL	70.98	66.92	137.34	126.70	-	119.52
CFD	10.20	5.82	11.22	10.70	7.86	9.46
IOD	6.26	4.76	6.68	7.72	6.40	6.38
SL	28.94	23.46	45.10	43.02	43.72	43.0
POL	28.30	21.38	29.12	29.58	24.90	26.50
ED	4.12	2.40	3.32	3.48	3.28	3.32
DPN						
BO	12.14	6.32	9.86	9.08	8.74	9.38
Raios Anais	508	497	752	748	698	729
AFR	410	420	380	-	-	-
PFR	19¿	19	14/15/16			
Raios peitorais	26	28	30	36	42	32

4. Capítulo II:

Investigação genômica por sequências repetitivas de DNA em duas espécies simpátricas do gênero *Rhamphichthys*, na Amazônia Oriental.

Patrícia Corrêa da Silva[1,4], Renata Coelho Rodrigues Noronha[1,3], Cleusa Yoshiko Nagamachi[1,2], Julio Cesar Pieczarka[1,2].

[1]Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Av Perimetral, SN. Guamá. 66075-900. Belém, Para, Brazil. [2]CNPq Pesquisador(a), Belém, Brazil. [3] Pesquisador(a) Laboratório de Citogenética, UFPA [4] Bolsista CNPq Programa de Genética e Biologia Molecular.

Autor correspondente Julio Cesar Pieczarka (juliopieczarka@gmail.com)

Resumo

A Ordem Gymnotiformes é composta por 219 espécies validas distribuídas em cinco famílias. Nosso objeto de estudos é o gênero *Rhamphichithys* e os espécimes aqui analisados foram coletados no Rio Caripetuba, Abaetetuba, Pará, sendo seis machos e quatro fêmeas da espécie *R. rostrarus* e duas fêmeas e dois machos de *Rhamphichithys marmoratus.* Foram produzidas sondas de rDNA 18S, 5S, e dos retroelementos da família REX1 e REX3. A sonda de rDNA 18S em ambas as espécies teve sua marcação coincidente com a marcação da NOR, o 5S por sua vez apresenta vários sítios de marcações, em *R. rostrarus* foram identificados em 7 pares de cromossomos e com destaque para o par metacêntrico nas regiões centroméricas e pericentroméricas, com evidência no par 3 portador do braço longo totalmente heterocromático com marcação positiva. As sondas dos retrotransposons REX 1 e REX 3 marcaram no genoma das duas espécies de forma dispersa. A sonda do REX1 em *Rhamphichthys rostratus* marcou na região coincidente com a constrição secundária do par portador da NOR. Nossos dados de 18S e 5S os corroboram com os já descritos em Gymnotiformes e demonstram uma evolução independente dos mesmos. Os retroelementos REX também costumam se encontrados dispersos em genomas de peixes, e o REX1 por ser evidenciado na constrição secundária de *Rhamphichthys rostratus* sugere que nesta região possa apresentar a presença de pseudogenes e co-localização com outros genes da família multigênica ribossomal.

Palavras- Chaves: Rhamphichithys, FISH, retroelementos REX, 18S e 5S.

Introdução

A ordem Gymnotiformes é composta por 219 espécies válidas de 35 gêneros, distribuídos em cinco famílias (Tagliacollo *et al.*, 2016). Os gêneros *Eigenmannia* e *Gymnotus* são os que apresentam a maior quantidade de informações citogenéticas (Henning, 2008; Cioffi, 2011; Scacchetti, 2011; Milhomem *et al.*, 2012, Milhomem *et al.*, 2011; Sene *et al.*, 2011;Nagamachi *et al.*, 2010), enquanto que a família Rhamphichithyidae ainda possui dados esparsos sobre a citogenética dos seus integrantes (Mendes *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo o mapeamento de genes ribossomais em peixes são comuns (Scacchetti, 2011; Santos, 2010; Nakajima *et al.*, 2012). O uso de novas metodologias, como a aplicação de sondas de regiões específicas de DNA moderadamente repetitivo como genes ribossomais e histonas, ou de regiões de DNA altamente repetitivo, como DNA satélite, tem possibilitado uma abordagem citogenética em nível molecular visando uma melhor compreensão da estrutura do genoma (Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Henning *et al.*, 2008).

As famílias multigênicas do RNA ribossomal (rRNA) são formadas por duas classes distintas, que estão dispostas em tandem no genoma dos eucariotos. A classe principal, gene 45S, é formada por um espaçador transcrito, seguido das regiões que transcrevem o rRNA 18S, 5,8S e 25S/28S, que são separados por dois espaçadores internos transcritos (ITS I e II). A classe menor, do gene 5S do rRNA, consiste em múltiplas cópias de uma região altamente conservada que possui 120 pares de bases, separados por uma região variável não-transcrita (NTS) (Eickbush & Eickbush, 2007). Em peixes, esta variação da região não-transcrita do rDNA 5S está relacionada à ocorrência de inserções, deleções e pseudogenes (Wasko *et al.*, 2001). Estas sequências são organizadas de maneira flexível, tanto em nível cromossômico, variando em número e posição dentro de um cariótipo (Cabral de Mello *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2005) como em nível nucleotídico, ocorrendo principalmente em regiões espaçadoras do rDNA 45S e 5S. Além disso, estes genes podem co-localizar-se com famílias multigênicas de histonas e também de genes de pequeno RNA nuclear (snRNA) (Pinhal *et al.*, 2011; Cabral de Mello *et al.*, 2010; Vierna *et al.*, 2011).

As sequências repetitivas podem estar presentes nos genomas eucariotos de duas formas: repetidas em tandem, tais como regiões satélites, minissatélites, microssatélites, ou repetidas de forma dispersa no genoma, como no caso dos elementos

transponíveis, transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994; Böhne *et al.*, 2008; Kidwell & Lisch, 2000). Em peixes estes elementos transponíveis estão relacionados ao tamanho, estrutura e desempenho do genoma (Volff, 2005; Volff et al, 2003,Volff *et al.*, 1999). Dentre estes elementos transponíveis a família dos retroelementos REX tem sido bastante investigada em alguns grupos de peixes (Silva *et al.*, 2014; Mazzuchelli & Martins, 2009; Borba *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013).

Material e Métodos

Os espécimes foram coletados no rio Caripetuba no município de Abaetetuba, Pará, Brasil ($1^{o}43'18"S$; $48^{o}52'45"W$). Os peixes foram classificados de acordo com Carvalho *et al.* (2015). Foram analisados exemplares de *Rhamphichithys rostratus* (6 fêmeas e 4 machos) e *Rhamphichithys marmoratus* (2 fêmeas e 2 machos). O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Invitrogen seguindo as instruções do fabricante. As sondas do RNA ribossomais 18S e 5S foram sintetizadas a partir de primers já descritos (Martins e Galetti, 2001). As sondas dos retroelementos Rex 1 e Rex 3 foram também produzidas a partir dos primers REX1-f (5' -TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3') e REX1-r (5' -TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3'); REX3f (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e REX3r (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3), descritos por Volff *et al.* (1999), formando bandas de DNA de 560 e 400 pares de bases, respectivamente. Esses *primers* se mostram bem eficientes e já foram utilizados em diferentes grupos de peixes (Ozouf-Coastaz *et al.*, 2004; Capriglione *et al.*, 2002).

As reações de PCR serão feitas de forma padronizada, em um volume final de 22 µl, de acordo com as concentrações a seguir: 1 µl de DNA (40ng/ µl), 2,5 µl de tampão 10X, 2,5 µl de DNTPs, 0,75 µl de MgCl2 (50 mM), 1,25 µl de cada primers forward e reverse (10 mM), 0,25 µl de Taq polimerase (5unidades/ µl) e 12,50 µl de água autoclavada, para então ser submetido ao termociclador com temperatura inicial de $95^{o}C$ por 3 minutos, e em seguida 30 ciclos de temperatura desnaturação $95^{o}C$ por 10 segundos, anelamento por 1 minuto, com temperatura variáveis de acordo com a sequência a ser amplificada, sendo 55°C para o DNAr 18S, 50°C para o 5S, 51°C para as sequências repetidas de REX1, e 53°C para REX3, e por fim manutenção a 4°C. O produto do PCR foi marcado por Nick translation com digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannhein,Germany). As sondas foram detectadas com anti-digoxigenina- FITC.

As hibridizações de in situ fluorescente (FISH) seguiram o protocolo de Pinkel *et al.* (1986) com adaptações. As imagens foram capturadas através de um microscópio Nikon com software de captura de imagens Nis-Elements e analisadas com auxilio do programa Adobe photoshop CS5.

Resultados

Os indivíduos pertencentes a espécie *Rhamphichithys marmoratus* apresentam o número diploide igual a 50 cromossomos, e fórmula cariotípica com 44 cromossomos meta/submetacêntrico e 6 cromossomos acrocêntricos. Já *Rhamphichithys rostratus* apresenta um novo citótipo com 48 cromossomos meta/submetacêntrico, 2 cromossomos acrocêntricos e de 6 a 10 cromossomos Bs, que está sendo descrito no outro artigo (Silva *et al.,* em redação). O mapeamento físico da sonda de rDNA 18S foi coincidente com os sítios ativos de rDNA encontrados através da impregnação por nitrato de prata (Figura 1A). A sonda de rDNA 5S marca 3 pares de cromossomos metacêntricos, mas nenhum coincidente com o par da NOR (Figura 1B). A espécie *Rhamphichithys rostratus* também apresentou a sonda de rDNA 18S coincidente com a região da NOR no par 12 (Figura 1C), e as marcações de rDNA 5S foram visualizadas em 7 pares de cromossomos metacêntricos em regiões centroméricas e pericentroméricas com destaque para o par 3, que apresentou o seu braço longo totalmente heterocromático com marcação positiva (Figura 1D). As sondas dos retrotransposons REX 1 e REX 3 marcaram no genoma das duas espécies de forma dispersa (Figura 2A e 2B) estando em maior concentração em regiões de heterocromatina constitutiva. Entretanto, a sonda do REX1 na espécie *Rhamphichthys rostratus* marcou também a região coincidente com a constrição secundária do par portador da NOR (Figura 2C). Já o retroelemento REX 3 nesta espécie, não apresentaram marcações nos cromossomos Bs (Figura 2D).citar os cluster

Discussão

Em Gymnotiformes é relatada a presença da NOR simples utilizando nitrato de prata (Foresti *et al.*, 1981) nas espécies *Apteronotus albifrons*, *Gymnotus carapo*, *Sternopygus macrurus*, *Eigenmannia virescens* e *Eigenmannia* sp. Geralmente, estes sítios ativos das regiões organizadoras de nucléolos são coincidentes com as marcações de sondas de rDNA 18S. Além da NOR simples, também já foram encontrados casos em que elas apresentam-se de forma múltipla, como em *Eigenmannia* sp. (Almeida-

Toledo *et al.*, 1996), *G. pantanal* (Fernandes-Matioli *et al.*, 2005) e *G. jonasi* (Milhomem *et al.*, 2011).

Em Rhamphichthyoidea, somente *B. pinnicaudatus* foi relatado com NOR múltipla por Almeida-Toledo *et al.* (2000). O gênero *Rhamphichthys* vem seguindo o padrão encontrado para Ordem, ou seja, a presença de um padrão de NOR simples e coincidente com a marcação da sonda rDNA 18S, com a presença de um polimorfismo de tamanho, devido a amplificações de alguns genes ribossomais (Mendes *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2013).

A investigação com sondas ribossomais rDNA 5S demostra marcações que não coincidem com as regiões de NOR tanto em *R. marmoratus* quanto em *R. rostratus*, sendo frequente a concentração destas sequências gênicas em regiões de heterocromatina constitutiva, como já descrito nas espécies *Gymnotus silvius* e *G. Inaequilabiatus* (Sccachetti, 2011). Este acúmulo em regiões heterocromáticas é frequentemente citado em peixes (Kazazian, 2004; Valente *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2004) e pode estar relacionado à ausência de recombinação nestas regiões e/ou estar envolvida na plasticidade das regiões heterocromáticas gênicas e não gênicas (Peng & Karpen, 2008).

Os elementos transponíveis também são frequentemente citados associados às regiões heterocromáticas do genoma, inclusive de peixes (Kazazian, 2004; Valente *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2004). No entanto também podem está associados a regiões eucromáticas (Gross *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009). Estas investigações genômicas descrevem um padrão de distribuição dos elementos retrotransposons REX1 e REX3 que corroboram com os já descritos, pois nas duas espécies de *Rhamphichthys*, aqui analisadas, verificamos ambos os elementos com comportamento disperso. Uma vez que o elemento REX 1 apresentou mais evidência de marcação na região coincidente com a marcação da sonda 18S, ou seja, no par da NOR da espécie *R. rostratus*, o que sugere que este elemento pode está associado a pseudogenes ou as regiões de NTS.

Referências

Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Toledo-Filho SA (2000) Sex chromosome evolution in fish: II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome systemin Gymnotiformes. Chromosome Res 8:335–340.

Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F, Toledo-Filho SA. (1996). Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). Chromosome Research, 4: 301-305.

Baum BR, Johnson DA(2007) The 5S DNA sequences in *Hordeum bogdonii* and the *H.brevisubulatum* complex, and the evolution and the geographic dispersal of the diploid *Hordeum* species (Triticeae: Poaceae). Genome 50: 1–14.

Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C,Volff JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. Chromosome Res. 2008; 16:203-15.

Borba SR, Silva EL e Parise-Maltempi PP (2013) Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. Mobile Genetic Elements 3:6, e27460.

Cabral-de-Mello DC, Cabrero J, Lopez-Leon MD, Camacho JP (2011) Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. Genetica, 139:921–931.

Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle Dichotomius geminatus provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. Heredity, 104:393–400.

Capriglione T, Odierna G, Caputo V, Canapa A (2002) Characterization of a Tc1-Like transposons in the Antarctic ice fish, *Chionodraco hamatus*. Gene 295:193-198.

Cardoso AL, Pieczarka JC, Feldberg E, Milhomem SSR, Moreira-Almeida T, Silva DS, Silva PC, Nagamachi CY (2010) Chromosomal characterization of two species of genus Steatogenys (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny). Rev Fish Biol Fisheries DOI 10.1007/s11160-010-9196-0.

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371:215-20.

Cioffi, Marcelo Bello (2011) Evolução cromossômica na família Erythrinidae. Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e microdissecção de cromossomos sexuais. Tese de Doutorado. Pós- graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular - São Carlos.

Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. Genetics, 175:477–485.

Fischer C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volff JN, Ozouf-Costaz C (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. Gene, 336:175–183.

Fernandes-Matioli FMC, Albert J, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Crampton WGR, Almeida-Toledo LF (2005). A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. Zootaxa, 933, 1-14.

Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions on fishes. Cytogenetic and Cell Genetics, 31: 137-144.

Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E (2009) Comparative cytogenetic analysis of the genus Symphysodon (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. Cytogenet Genome Res, 127:43–53.

Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008) Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). Cytogenetic and Genome Research, 121: 55-58.

Kazazian HH Jr (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. Science, 303:1626–1632.

Kidwell MG e Lisch DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. Trends Eco Evolution 15(3):35-99.

Mantovani M, Dos L, Abel S, Moreira-Filho O (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae). Genetica, 123:211–216.

Martins C, Galetti Jr. PM (2001) Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? Genetica, 111: 439-446.

Mazzuchelli J, Martins C. (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus.* Genetica 136:461-9; PMID:19112556; http:// dx.doi.org/10.1007/s10709-008-9346-7.

Mendes VP, Portela-Castro AL, Júlio-Junior HF (2012) First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. Comparative Cytogenetics 6: 1-16.

Milhomem SSR, Crampton WGR, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2012) *Gymnotus capanema* a new species of electric knife fish (Gymnotiformes, Gyminotidae) from eastern Amazonia, with comments on an unusual karyotype. Journal of fish biology 80:(4) 802-815. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03219x.

Milhomem SSR, Crampton WGR, Pieczarka JC, Silva DS, Cardoso AL, Silva PC, Oliveira JA, Nagamachi CY (2011) Chromosomal and electric signal diversity in three sympatric electric knifefish species (Gymnotus, Gymnotidae) from the Central Amazon Floodplain. Rev Fish Biol Fisheries. DOI 10.1007/s11160-011-9239-1.

Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, Souza ACP, Ferguson-SmithMA (2010) Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, G*ymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. BMC Genetics, 11: 28.

Nakajima, RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC e Martins C (2012) Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. BMC Evolutionary Biology. 12:198

Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF (2007) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Fish Cytogenetics. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Enfield, Science Publisher, 111-164.

Oliveira C, Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Chromosome Research, 6: 205- 11.

Ozouf- Costaz C, Brandt C, Körting C, Pisano E, Bonillo C (2004) Genome dynamics and chromossomal localization of the non- LTR retrotransposons REX1 and REX3 in Antarctic fish. Antarctic Science 16: 51-57.

Peng JC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. Curr Opin Genet Dev. 18(2): 204. doi:10.1016/j.gde.2008.01.021.

Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C (2011) The 5s rDNA family evolves through concerted and bith-and- death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. BMC Evolutionary Biology, 11:151.

Phillips RB, Reed KM (1996) Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. Aquaculture, 140: 197-216.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Science 83: 2924-2938.

Santos, Natália Machado dos (2011) Mapeamento gênico de sítios repetitivos de rDNA 5s e 18s em Astyanax scabripinnis (Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado. Pós- graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Unesp- Botucatu.

Scacchetti, Priscilla Cardim. Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S nos cromossomos de espécies simpátricas do gênero *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae) (2011). Dissertação de Mestrado Pós- graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Unesp - Botucatu.

Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, do Carmo EJ, Martins C, Feldberg E. (2013) Evolutionary dynamicsof retrotransposable elements *Rex1, Rex3* and *Rex6* in neotropical cichlid genomes. BMC Evol Biol 13:152.

Sene, Viviane França de (2011) Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae), Dissertação de Mestrado.Unesp- Botucatu.

Silva M, Ribeiro ED, Matoso DA, Sousa LM, Hrbek T, Py-Daniel LR e Feldberg E (2014) Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistirus* (Siluriformes: loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. Genética. V 142. DDOI 10.1007/s10709014-9760-y.

Silva PC, Nagamachi CY, Silva DS, Milhomem SSR, Cardoso AL, Oliveira. JA, Pieczarka JC (2013) Karyotypic similarities between two species of *Rhamphichthys* (Rhamphichthyidae, Gymnotiformes) from the Amazon basin. Comparative Citogenetics doi: 10.3897/CompCytogen.@@.4366.

Tagliacollo VA, Bernt MJ, Craig JM, Oliveira C , Albert JS (2016) Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 95 (2016) 20–33.

Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, Martins M (2009) Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish Cichla kelberi and its contributions to the knowledge of fish genomes. Cytogenet Genome Res, 125:224–234.

Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C (2011) Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid cish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. Cytogenet Genome Res, 133:34–42.

Vierna J, Jensen KT, Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon AM (2011) The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). Heredity, 107:127–142.

Volff JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity, 94:280–294.

Volff JF, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. Trends Genet., 19:674–678.

Volff JN, Korting C, Sweeney K, Schartl M (1999) The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish Xiphophorus is widespread among teleosts. Mol Biol Evol, 16:1427–1438.

Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti PM Jr (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon* . Genome 44: 893–902

Figuras

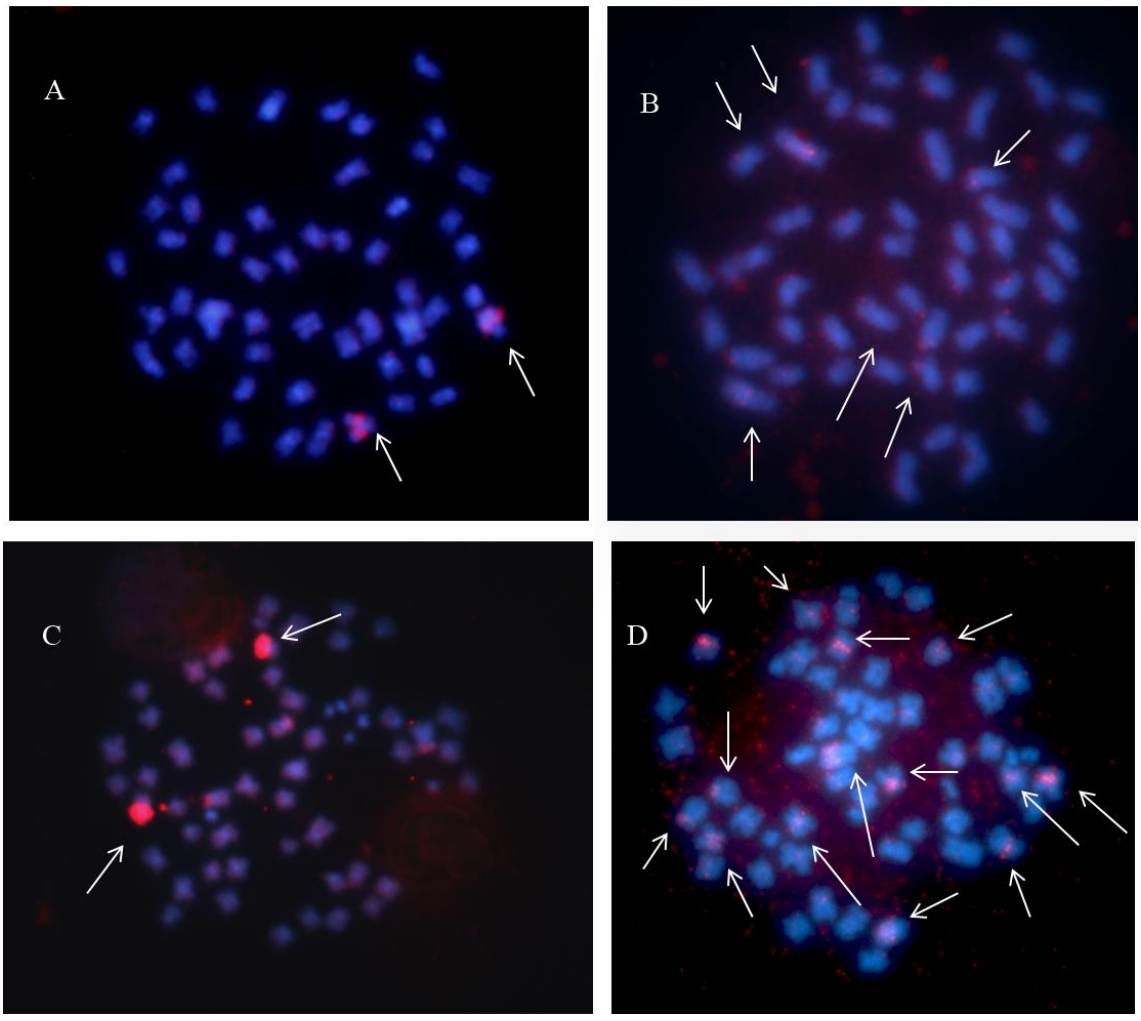

Figura 1: A) Marcação da sonda18S em *R. marmoratus.* B) Marcação da sonda 5S em *R. marmoratus.* C) Marcação da sonda18S em *R. rostratus.* B) Marcação da sonda 5S em *R. rostratus.*

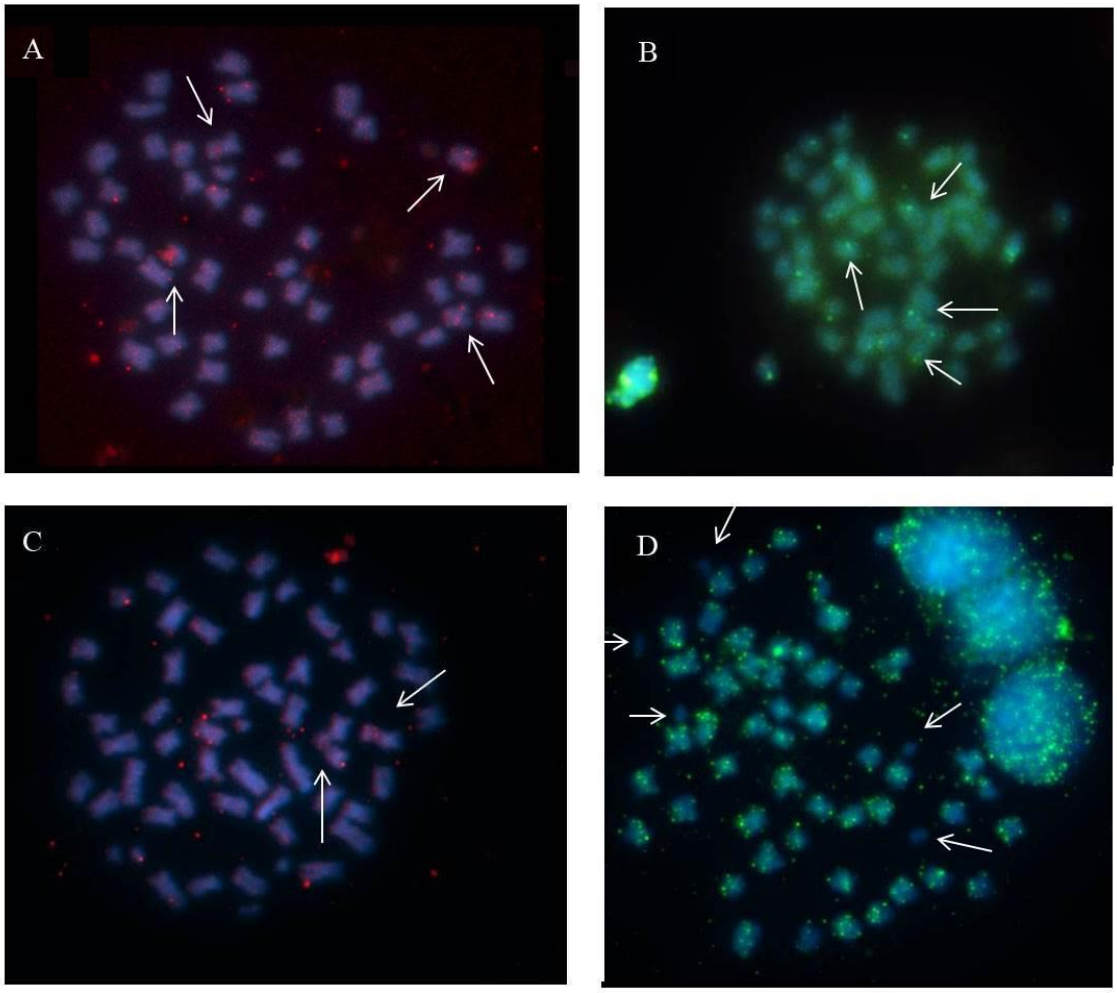

Figura 2: A) Marcação do retroelemento REX1 em *R. marmoratus*, com destaque para nas regiões heterocromáticas. B) Marcação do retroelemento REX 3 em *R. marmoratus*, com destaque de marcações em regiões pericentroméricas C) Marcação do retroelemento REX1 em *R. rostratus*, evidente marcação no par da NOR B) Marcação do retroelemento REX 3 em *R. rostratus*, as setas indicam a não marcação do retroelemento REX3 nos cromossomos Bs.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou uma análise citogenética e molecular para o gênero *Rhamphichithys,* sendo analisadas as espécies *R. marmoratus* e *R. rostratus* pertencentes a família Rhamphichthyidae. Estes espécimes foram coletados em diferentes localidades da região amazônica.

Apesar de serem classificados taxonomicamente como mesma espécie, espécimes coletados no Rio Caripetuba, do município de Abaetetuba, estado do Pará, inicialmente identificadas como *R. rostratus*, foram definidas como espécies crípticas, pois as diferenças genéticas encontradas em seus cariótipos diferenciam os citótipos analisados. Alguns indivíduos apresentaram como fórmulas cariotípicas FC = 42 m/sm + 8 a, enquanto, o novo citótipo apresentou FC = 48 m/sm + 2a + (5-10) B.

Além disso, peculiaridades de padrões de distribuição de heterocromatina e de elementos repetitivos do genoma foram investigados como formas de diferenciar citogenomicamente estas espécies. A análise do DNA barcoding corroborou os dados cromossômicos que encontramos, demonstrando a necessidade de uma revisão para a família Rhamphichithyidae que, como as demais famílias da Ordem Gymnotiformes, deve estar com seu número de espécie subestimada.

A evolução cariotípica desta família sugere que uma constância na manutenção de seu número diploide, pois percebemos isto, diante da manutenção de 2n=50 na superfamília Rhamphichthyoidea, na qual está inserida. Provavelmente os cromossomos B que se apresentam neste novo citótipo possam estar relacionados a eventos de quebras cromossômicas, pois nestes são evidenciados sequências teloméricas, que lhes conferem certa estabilidade no ciclo celular, e também outras sequências repetitivas, como foi o caso, de marcações positivas do REX1.

A distribuição dos retroelementos REX1 e REX 3 nos genomas das espécies analisadas se deu de forma dispersa, estando presente tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas, com destaque para o REX1 que na espécie de novo citótipo apresentou acúmulo na região da NOR. Estas evidências já foram descritas na literatura quando algumas espécies de peixes passam por estresse ambiental ou quando investigadas em híbridos.

A investigação da família multigênica ribosssomal demonstrou o 18S coincidente com a região organizadora de nucléolo (NOR), e o sítio de 5S marcando

múltiplos cromossomos, preferencialmente em regiões heterocromáticas e centroméricas, demostrando que a evolução de ambos ocorre de maneira independente neste grupo de peixes. Estas marcações múltiplas do rDNA 5S podem estar relacionadas a regiões de pseudogenes, ou inserções de outras sequências repetitivas.

A importância de somar dados que corroborem com o melhor entendimento da família Rhamphichithyidae é que estes peixes apresentam maior abundância e diversidade de espécies na região amazônica e são espécies bioindicadoras de poluição, com potencial para serem utilizadas em projetos de monitoramento ambiental.

6. REFERÊNCIAS

Albert JS & Crampton WGR (2005) Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). Pp. 360-409. In: Bullock, TH, Hopkins, CD; Popper, AN & Fay, RR. (Eds.). Electroreception. v 21. New York, Springer Handbook of Auditory Research, p 485.

Albert JS & Crampton WGR (2003) Seven new species of the neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). Zootaxa, n.000, p.1–54.

Albert JS (2001) Species diversity and phylogenetics systematics of American Knifefish (Gymnotiformes, Teleostei). Misc. Public. Mus. Zool. University of Mishigan 190: 1-129.

Albert JS, Campos-Da-Paz R (1998) The Gymnotiform "Eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre,Brasil, 401-417.

Albert JS & Fink WL (1996) *Sternopygus xingu*, a new species of electric fish from Brazil (teleostei, Gymnotoidei), with comments on the phylogenetic position of *Sternopygus*. Copeia, 85- 102.

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Almeida-Toledo S (1981) Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apteronotus albifrons* (Pisces, Apteronotidae). Experientia 37:953-954.

Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Toledo-Filho SA (2000a) Sex chromosome evolution in fish II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. Chromosome Research 8:335-340.

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel-Silva MFZ, Toledo-Filho SA (2000b) Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). Chromosoma 109:197–200.

Almeida-Toledo LF, Foresti F, Péquignot EV, Daniel-Silva MFZ (2001) XX:XY Sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome

differentiation in the neotropic eletric eel *Eigenmannia virescens*. Cytogenetics and Cell Genetics 95:73-78.

Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Moysés CB, Fonteles SBA, Lopes CE, Akama A, Foresti F (2002) Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae). Cytogenetic and Genome Research 99:164-169.~

Almeida-Toledo L F, Moisés CB, Daniel-Silva MFZ, Foresti F (2005) Caracterização citogenética de *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes) nas bacias dos rios São Francisco e bacia Superior do rio Paraná: uma atualização. In: Congresso Brasileiro De Genética, 51- Águas de Lindóia, SP. Anais... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, CD-ROM.

Artoni RF, Vicari MR, Bertollo LAC (2000) Neotropical fish cytogenetics: methods, results and perspective. Biological Health Sciences 6 :1 p.43-60.

Alves-Gomes JA (1998) The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitocondrial DNA sequences. In: Malabarba, LR; Reis, RE; Vari, RP; Lucena, ZMS; Lucena, CAS. (Eds.). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs, p.447-460.

Alves-Gomes JA, Guillermo O, Haygood M, Heiligenberg W, Meyer A (1995) Phylogenetic analysis of the South American electric fish (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. Molecular Biology and Evolution, v.12, n.2, p.298-318.

Aparício S., Chapman J., Stupka E., Putnam N (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. Science. v297, p1301-1310.

Beukeboom, L. W (1994). Bewildering B: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. Heredity, 73, 328-336.

Biet E., Sun J., Dutreix M. (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. Nucleic Acids Research. v27, p596-600.

Blanco, Daniel Rodrigues (2012) Estudos citogenéticos clássicos e moleculares de em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae) com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução do grupo. Tese de doutorado. Orientador: Orlando

Moreira filho. Pós- graduação em Genética evolutiva e biologia molecular. Universidade Federal de São Carlos.

Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. Phylos. T. Roy. Soc. B. 359: 669-679.

Borba RS, Silva EL & Parise-Maltempi PP (2013) Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. Mobile Genetic Elements 3:6.

Bullock TH & Chichibu S (1965) Further Analysis of sensory in electroreceptores of electric fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American. v.54, nº 2. p 422-429.

Camacho JPM (2005) B Chromosome. In: Gregory TR, ed. The evolution of Genome, San Diego, Elsevier, p 223-286.

Camacho, JPM; Sharbel, TF and Beukeboom, LW (2000) B- Chromosome Evolution. *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* B 355, p163- 178.

Campos-Da-Paz R, Albert JS (1998) The Gymnotiform "Eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). In: Malabarba LR., Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. (Eds.). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs, p.401-417.

Campos-da-Paz, R., and H. J. Paepke (1994) On *Sternarchorhamphus hahni*, a member of the rhamphichthyid genus Rhamphichthys (Ostariophysi: Gymnotiformes). Ichthyological Exploration of Freshwaters 5:155–159.

Capriglione T, Odierna G, Caputo V, Canapa A, Olmo E (2002) Characterization of a Tc1-like transposon in theAntarctic ice-fish, Chionodraco hamatus. Gene 295:193–198.

Cardoso AL, Ready JS, Pieczarka JC, Milhomem SSR, Figueiredo-Ready WMB, Silva FHR, Nagamachi CY (2015) Chromosomal Variability Between Populations of Electrophorus electricus Gill, 1864 (Pisces: Gymnotiformes: Gymnotidae). Zebrafish, Volume 00, Number 00, DOI: 10.1089/zeb.2014.1059.

Cardoso AL, Pieczarka JC, Feldberg E, Milhomem SSR, Moreira-Almeida T, Da Silva PC, Nagamachi CY (2011) Chromosomal characterization of two species of genus *Steatogenys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21: 613-621.

Carvalho, RA (2008) Ocorrência de cromossomos B em peixes neotropicais e análise citogenética em *Iheringichthys labrosus* e *Megalonema platanum* (Teleostei, Pimelodidae). Universidade Estadual de Maringá. Tese de Doutorado.

Carvalho,TP e Albert, JS (2015) A New Species of *Rhamphichthys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) from the Amazon Basin. Copeia 103, 01 p 34-41.

Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371: 215-220.

Cioffi, Marcelo de Belo (2011) Evolução cromossômica na família Erythrinidae. Mapeamento citogenético de DNAs repetitivos e microdissecçãode cromossomos sexuais. Tese de doutorado. Programa de Pós – Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. UFSCAR- São Carlos –SP.

Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus.* Implications for genome change and karioevolution in fish. BMC Evolutionary Biology 10: 271.

Crampton WGR (2011) An ecological perspective on diversity and distributions. In: Albert JS, Reis RE. Historical Biogeography of Neotropical freshwater Fishes. University of California Press, p.165-189.

Crampton WGR (2006) Evolution of electric signal diversity in gymnotiform fishes. II. Signal design. In: Ladich F, Collin SP, Moller P & Kapoor BG (Eds.), Communication in Fishes. Enfield, NH: Science Publishers Inc., p.696-731.

Crampton WGR, Albert JS (2005) Evolution of electric signal diversity in the gymnotiform fish. In Fish communication Edited by: Collin SP, Kpoor BG, Ladich F, Moller P. Science Publisher Inc, New York.

Crampton WGR (1998) Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of fishes.Journal of Fish Biology 53 (Supplement A): 307-330.

Csink AK, Henikoff S (1998) Large-scale Chromosomal Movements During Interphase Progression in *Drosophila.* The Journal of Cell Biology. v143, n1, p13-22.

Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HHJr(2003) Mobile elements and mammalian genome evolution. Current Opinion in Genetics & Development. v13, p 651-658.

Epplen JT (1988) On simple repeated GATA/GACA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. Journal Hereditare 79: 409- 417.

Fantinatti, Bruno Evaristo de Almeida (2011) Contribuições ao conhecimento de cromossomos supranumerários em peixes, utilizando como modelo Haplochromis obliquidens (Perciformes, Cichlidae). Dissertação de mestrado. Orientador: Prof.Dr. César Martins. Pós- graduação de Genética. Unesp, Botucatu.

Fernandes-Matioli FMC, Marchetto MCN, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1998a) High intraspecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian basins. Caryologia 51(3-4):221-234.

Fernandes FMC, Albert JS, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Crampton WGR, Almeida-Toledo LF (2005) A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. Zootaxa 933:1-14.

Fernandes CA & Martins-Santos IC (2006) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. Genetic Mololecular Biology 29:464-468.

Ferraris CJ (2003) Family Rhamphichthyidae. In: Reis RE; Kullander SO; Ferraris-Junior CJ. (eds), Checklist of the freshwater fishes of South an Central America. Porto Alegre: Edipucrs, p.492-493.

Ferreira IA, Oliveira C, Verene PC, Galetti PM & Martins C (2007) 5S rDNA variation and its phylogenetic interference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). Genetica, 29 (3), p 253-257.

Flavel RB (1986) Repetitive DNA and chromosomes. Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci 312:227-242.

Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1984) Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp *(Pisces Gymnotidae)*. Caryologia v (37), p 141-146.

Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. BMC Plant Biol., v (10): 176.

Gayet, M., Meunier, F. J. & Kirschbaum, F. 1994. *Ellisella kirschbaumi* Gayet Meunier, 1991, gymnotiforme fissile de Bolivie et ses Relations phylogénétiques au sein des formes actuelles. Cybium, 18: 273-306.

Gregory TR (2005) Genome size evolution in animals. In: The Evolution of the Genome, Ed., pp. 3-87, Elsevier, San Diego.

Griffiths AL, Wessler SR, Gelbart WM, Suzuki DT & Miller JH (2006) Introdução a genética . 8 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro p. 123,181, 184, 192.

Gouvêa FJ, Stopa RM, Paula HMG, Hoshino K (2002) Suspensão das descargas de eletrolocação-comunicação e tamanho corporal no peixe elétrico *Gymnotus carapo* Miller 1966 (Osteichtyes, Gymnotidae). Revista Brasileira de Zoociências 4: 203-214

Hebert P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball & J.R. de Waard. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 270: S569-S599.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci, 270:S96-99.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., Francis, C. M. (2004a) Identification of birds through DNA Barcodes. PLoS Biol, 2(10):1567-1663.

Hebert, P. D. N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. Proc Natl Acad Sci USA, 101(41):14812-14817.

Hopkins CD (1974) Eletric communication in fish. American Scientist, v. 62, p. 426-427.

Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biémont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, De Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigó R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quétier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Roest Crollius H. (2004) Analysis of the Tetraodon nigroviridis genome reveals the protokaryotype of bony vertebrates ans its duplication in teleost fish. Nature. V 431, p 946-957.

Kawasaki M, Prather J, Guo YX (1996) Sensory cues for the gradual frequency fall responses of the gymnotiform electric fish, *Rhamphichthys rostratus*. Journal of Comparative Physiology A 178: 453-462.

Kedes LH (1979) Histone genes and histone messengers. Ann Rev Biochem 48:837-870.

Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. Genetica 115:49-63.

Lacerda MCV, Maistro EL (2007) Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. Cytologia 72: 89–93.

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

Lui Z., Li P., Kocabas A., Karsi A., Ju Z. (2001) Microsatelite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. Biochemical and Biophysical Research Communication. V 289, p317-324.

Mago-Leccia F (1994) Electric fishes of the continental waters of America. Biblioteca de la Academia de Ciencias Fisicas, Matematicas, y Naturals, Caracas, Venezuela 29: 1-206.

Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O. (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces,Characidae). Genetica, 123: 211-216.

Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O (2011) Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. Comparative Citogenetics, 5(4): 289–300.

Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM (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, Oliveira C, Wasko AP, Wright JM (2004) Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent *in situ* hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. Aquaculture. v231, p37-49.

Martins C, Galetti Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Res 7:363–367.

Mazzuchelli J, Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. Genetica 136: 461-469.

Mcallister BF and Werren, JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma, 106, 243-253.

Mendes VP, Portela-Castro AL, Júlio-Junior HF (2012) First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. Comparative Cytogenetics 6: 1-16.

Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini SR, Ruizá IRG,Abel LDS , Moreira-filho O & Camacho JPM (2000) structural and functional evidence that a B chromosome in the characid *astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Hereditary.V (85): 1-9.

Milhomem SSR, Piekzarka JC, Crampton WGR, Silva DS, Souza ACP, Carvalho Jr JR and Nagamachi CY (2008) Chromosomal evidence for a criptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics* **9**:75. Doi:10.1186/1471-2156-9-75.

Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Souza ACP, Carvalho Jr JR, Nagamachi CY (2007) Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern Amazon of Brazil. Zootaxa 1397:55-62.

Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. Insect Molecular Biology 14:713-717.

Nanjappa P, Brand L, Lannoo MJ (2000) Swimming patterns associated with foraging in phylogenetically and ecologically diverse American weakly electric teleosts (Gymnotiformes). Environmental Biology of Fishes 58: 97-104.

Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C (2012) Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. BMC Evolutionary Biology, V 12:198.

Nelson JS (2006) Fishes of the word. USA,4 ed.

Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. Fish Physiology and Biochemistry 35(1): 81-100.

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F (2007) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F (eds) Fish cytogenetics. Science Publishers, Enfield, USA.

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo Filho SA (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwather fishes. Rev. Brasil. Genética 11(3):577-624.

Ozouf- Costaz C, Brandt C, Körting C, Pisano E, Bonillo C (2004) Genome dynamics and chromossomal localization of the non- LTR retrotransposons REX1 and REX3 in Antarctic fish. Antarctic Science 16: 51-57.

Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Silva GJC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2014) Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus Characidium. Plos one. V(9) e107169.

Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F (2011) Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). Journal of Fish Biology, 78: 183-194.

Pauls, E; Bertollo, LAC (1983) Evidence for a system of supranumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Caryologia 36: 307-314.

Pazian MF, Pereira LHG, Shimabukuru-Dias CK, Oliveira C, Foresti F (2012) Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus *Piabina* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology, 10(2): 329-340.

Pieczarka JC, Mattevi MS (1998) Heterocromatina constitutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (Série Monografias) (7)185-225.

Pieczarka JC, Nagamachi CY, Souza ACP, Milhomem SSR, Castro RR, Nascimento AL (2006) An adaptation to DAPI-banding to fishes chromosomes. Caryologia59(1):43–46.

Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. Gene 409: 72–82.

Porto FE, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC (2010) Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. Genetic and Molecular research. 9 (3): 1654-1659.

Prokopovich CD, Gregory TR, Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. Genome 46: 48-50.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (2003) Check list of the freshwater fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre.

Ribeiro, Leila Braga (2013) Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em *Colossoma macropomum* (Chararciformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura. Tese de Doutorado- Orientadora: Eliana Feldberg – INPA, Manaus.

Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP (2006) Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. Genetica 128:159–166

Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. Comparative Cytogenetics 5(4): 301-313. doi:10.3897/CompCytogen.v5i4.1650.

Santos, GM; Merona, B; Juras, AA. e Jégu, M. (2004) Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí. Brasília, Eletronorte.

Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R (2011) Karyotypic diversity in four species of the genus Gymnotus Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences.Comparative Cytogenetic v (5): 223-235.

Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Carmo E Jr, Martins C, Feldberg E (2013) Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in neotropical cichlid genomes. BMC Evolutionary Biology , V(13): 152.

Sczepanski, Thaís Saad (2008) Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (teleostei, siluriformes) pertencentes ao Litoral paranaense. Dissertação de mestrado. Pós- graduação em genética. UFPR

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti, F, Foresti F (2014) Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in Astyanax paranae (Teleostei, Characiformes). Plos one. 9:1-10.

Silva DS, Milhomem SSR, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2009) Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of the sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. BMC Genetics 10:74. Doi:10.1186/1471-2156-10-74.

Silva DS, Milhomem SSR, Souza ACP, Pieczarka JC and Nagamachi CY (2008) A conserved karyotype of *Sternopygus macrurus* (Sternopygidae, Gymnotyformes) in the Amazon region: Differences from other hydrographic basins suggest cryptic speciation. Micron 39:1251-1254.

Silva EB.; Margarido VP (2005) An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). Environmental biology of fishes, n.73, p.293–297.

Silva M, Ribeiro ED, Matoso DA, Sousa LM, Hrbek T, Py-Daniel LR & Feldberg E (2014) Chromosomal polymorphism in two species of Hypancistrus (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. Genética v 142. DOI 10.1007/s10709-014-9760-y

Silva PC, Nagamachi CY, Silva DS, Milhomem SSR, Cardoso AL, Oliveira JA, Pieczarka JC (2013) Karyotypic similarities between two species of *Rhamphichthys* (Rhamphichthyidae, Gymnotiformes) from the Amazon basin. Comparative Citogenetics doi: 10.3897/CompCytogen.@@.4366.

Slijepcevic, P (1998) Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. Chromosoma,107:136-140.

Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN (2005) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae).doi: 10.1073_pnas.0511318103 PNAS. V 103,p. 3657–3662.

Souza IL, Galián J, De La Rúa P, Bertollo LAC and Moreira–Filho O (2001) Non–random distribution of the GC–rich heterocromatin and nuclear rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. Cytologia 66:85–91.

Sullivan JP (1997) A Philogenetic study of the Neotropical Hipopomid electric fishes (Gymnotiformes: Rhamphichyoidea). Dissertation Department of Zoology Duke University.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75:304–306.

Tagliacollo VA, Bernt MJ, Craig JM, Oliveira C , Albert JS (2016) Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 95 (2016) 20–33.

Triques ML (2005) Novas sinapomorfias para *Rhamphichthys* Muller &Troschel, 1848 (Teleostei: Rhamphichthyidae). Lundiana 6 (1): 35-39.

Triques ML (1996b) *Iracema cayana*, new genus and species of electrogenic neotropical freshwater fish (Rhamphichthyidae: Gymnotiformes: Ostariophysy: Actinopterygii) Révue Française d'Aquariologie et Herpetologie 23 (3/4): 91-92.

Triques ML (1993) Filogenia dos gêneros de Gymnotiformes (Actinopterygii, Ostariophysi), com base em caracteres esqueléticos. Porto Alegre: Comun. Mus. Ciênc. PUCRS (Série Zoologia), v.6, p.85-130.

Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD e Martins C (2014) Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish Astatotilapia latifasciata Based on Integrated Genomic Analyses. Molecular Biology Evolution 31 (8): 2061-2072.

Valente GT, Vitorino CA, Cabral-de-Mello DC, Oliveira C, Lima Souza I, Martins C, Venere PC (2012) Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia River system, Brazil, by conventional cytogenetic methods Comparative Cytogenetics 6(2): 163–181.

Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB,Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertolo LAC, Artoni FR (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. J fish biology.76: 1094-1116.

Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC (2006) ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). Cytogenetic Genome Resource, V114: 163–168.

Vicente VE, Jesus CM, Moreira-Filho O (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three Parodonspecies (Pisces, Parodontidae) Caryologia .V (54) 4: 365-369.

Volff J.N., Bouneau L., Ozouf-Costaz C., Fischer C. (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. Trends in Genetics. v19, n12, p 674-678.

Voltolin, Tatiana Aparecida (2012) Origem, herança e estruturas dos cromossomos B no gênero *Prochilodus* (Characiformes: Prochilodotidae). Tese de Doutorado- Orientador: Fausto Foresti. Unesp –Botucatu- SP .

Waugh, J (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays 29, 188–197.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 359:1847-1857.

Witt, JD, Threloff, DL & Hebert, PD (2006) DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. Molecular Ecology,15: 3073–3082.

Yano CF, Bertollo LAC, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB (2014) Genomic organization of repetitive DNAs and its implications for male karyotype and neo-Y chromosome differentiation in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes: Erytrinidae). Comparative Cytogenetics 8(2): 139-151.

ANEXOS

MATERIAL E MÉTODOS

A) MATERIAL

A1) Caracterização das Amostras

Os exemplares do gênero Rhamphichthys (Rhamphichthydae), cuja classificação se encontra abaixo, foram coletados em rios de duas localizações distintas na Bacia Amazônica: Dois exemplares (um macho e uma fêmea) provenientes do Rio Parú no Município de Almeirim no Estado do Pará, Município de Abaetetuba Rio Anequara (3 fêmeas e 1 macho), Rio Caripetuba (um macho e uma fêmea), Município de Barcarena, Rio Arienga (um macho e uma fêmea), Município de Igarapé-Miri (um macho e uma fêmea) na Amazônia Oriental, e 13 exemplares (7 machos e 6 fêmeas) provenientes do

Município de Alvarães coletados no Rio Mamirauá dentro Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazônia Ocidental. As coletas foram realizadas com malhadeiras de 20mm com 20 metros de comprimento por 2 metros de altura, e supervisionadas de três em três horas, para favorecimento da sobrevivência dos peixes capturados. Os exemplares coletados posteriormente foram transportados vivos para o Laboratório de Biologia Aquática do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, ou para um laboratório improvisado de campo, sendo necessário acondicioná-los em sacos plásticos de 30 litros com água e oxigênio puro. Outro método de coleta foi a utilização de tarrafas e detectores de Gymnotiformes.

Subfilo: Vertebrata
Superclasse: Gnathostomata
Grade: Teleostomi
Classe: Actinopterygii
Subclasse: Neopterygii
Divisão: Teleostei
Subdivisão: Euteleostei
Superordem: Ostariophysi
Ordem: Gymnotiformes
Família: Rhamphichthydae
Gênero: Rhamphichthys Muller &Troschel, 1848

A2) MÉTODOS

A2.1 Indução de Mitoses

Para a obtenção de um índice mitótico satisfatório nas preparações cromossômicas seguiremos a técnica descrita por Bertollo *et al.* (1978) com modificações:

Injetar uma solução aquosa de fermento biológico (0,5g de fermento biológico com 0,5g de sacarose diluído em 7ml de água destilada), na proporção de 1ml/100g de seu peso corpóreo, na região dorso-lateral do peixe.

Manter o animal em um sistema de aquário aerado e bem iluminado, em média, por 48 horas.

A2.2 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

Os cromossomos mitóticos destes peixes serão obtidos através de seu órgão hematopoiético, o rim encefálico ou então o caudal, seguindo o protocolo de técnicas de Bertollo *et al.* (1978) com modificações:

Injetar no dorso do animal, na proporção de 1ml /100g de peso corpóreo do peixe a solução de colchicina na concentração de 0,025%.

Mantê-lo em tanque aerado por 45 minutos, para em seguida sacrificá-lo e fazer a retirada de seu órgão hematopoiético.

Colocar em uma placa de Petri em torno de 15ml de solução hipotônica (5,6g de cloreto de potássio em um litro de água destilada).

Dissociar por completo o material com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, e posteriormente ressuspender em uma seringa de vidro, até tornar a solução homogênea.

Incubar a suspensão em uma estufa a 37ºc por 30 minutos.

Interromper a ação da solução hipotônica com algumas gotas de fixador Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético).

Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm, descartar o sobrenadante, e ressuspender o pelet em fixador Carnoy.

Repetir o item acima em média três vezes.

Conservar o material fixado em freezer.

A2.3 Técnica de Coloração Convencional

Para a análise convencional das lâminas em microscópio óptico, o material citológico será corado com Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa (Merck), como se segue:

Diluir 0,3 ml de corante Giemsa para 3ml de tampão fosfato pH 6,8.

Despejar a solução na lâmina e deixar agir por 10 minutos.

Lavar com água destilada e deixar secar para ser feita sua análise.

A2. 4 Técnica de Bandeamento C

Será realizada a partir da técnica de Sumner (1972) com modificações, objetivando detectar a presença da heterocromatina constitutiva (HC) nos cromossomos das espécies em estudo.

Tratar as lâminas com HCl à 0,2 N em temperatura ambiente por 15 minutos. Lavar com água destilada e deixar secar.

Incubar lâmina a em solução aquosa de Hidróxido de Bário (Ba (OH)2) a 2% durante 35 segundos à 46 ºC.

Imergir imediatamente em HCl a 0,1N à 46ºC para interromper a ação do Hidróxido de Bário e em seguida lavar com água gelada. Deixar secar.
Incubar a 60ºC em solução salina de 2xSSC, durante 20 minutos.
Lavar com água destilada. Deixar secar.
Corar com solução de Wright na proporção de 3:1 por 20 minutos.

A.2.5 Técnica de Detecção de NOR por AgNO3 (AG-NOR)

Será utilizada a técnica de impregnação por Nitrato de Prata (AgNO3) segundo Howell & Black (1980), com adaptações para a detecção de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs):
Colocar a lâmina durante 3 minutos em solução de HCl 0,2 N em temperatura ambiente, lavar e deixar secar.
Colocar sobre a lâmina uma gota de solução aquosa de gelatina e duas gotas de Nitrato de Prata.
Cobrir com uma lamínula de 24x50mm, inverte-la e incubá-la em uma câmara escura úmida, por 5- 8 minutos, em banho-maria a 60ºC.
Lavar a lâmina com um jato de água destilada de forma que seja removida a lamínula e o excesso de reagentes. Deixar secar.
Corar a lâmina com Giemsa na proporção 3:1, durante um minuto.

A2.6 Técnica de Coloração pelo Fluorocromo DAPI (4', 6'- diamidino -2-phenylindone)

Será utilizada a técnica descrita por Pieczarka *et al.* (2006) para a marcação das regiões ricas em pares AT, como se segue:
Desidratar a lâmina contendo a preparação citológica em uma bateria de álcool (2x álcool 70% por 2 minutos, 2x álcool 90% por 2 minutos, e 1x álcool 100% por 4 minutos).
Incubar na estufa a 60º C por uma hora.
Desnaturar a 70ºC a lâmina em uma solução de formamida a 70%, no banho-maria.
Interromper a ação da formamida transferindo a lâmina para um frasco contendo etanol a 70% gelado por 4 minutos.
Repetir o item a.
Mergulhar a lâmina em um frasco contendo a solução de DAPI, deixando agir por 30 minutos em estufa a 37ºC.

Montar a lâmina com 50µL de solução de antifade Vectashield H-1000 (Vector), cobrindo com lamínula de vidro 24x50mm.

A.2.7 Técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S

A sonda de rDNA 18S marca regiões gênicas específicas de produção do RNA ribossomal. Técnica segundo Daniels & Delayne (2003) com adaptações :

a) A lâmina deve estar envelhecida por dois dias para ser tratada com RNAse (1µL / 1000 µL de 2 SSC).

b) Incubar a lâmina com 200 µL da solução de RNAse coberta com um parafilme por 20 minutos em estufa a 37ºC.

c) Lavar a lâmina em 2 SSC por 2 minutos.

d) Lavar em pepsina (500 µL de pepsina em 50 µL de HCl 4,8 N) por 3 minutos.

e) Desidratar a lâmina contendo a preparação citológica em uma bateria de álcool (2x álcool 70% por 2 minutos, 2x álcool 90% por 2 minutos, e 1x álcool 100% por 4 minutos).

f) Desnaturar a sonda em banho-maria a 65ºC por 15 minutos.

g) Hibridizar com 2 µL de sonda rDNA18S biotinilada com 12µL de tampão de hibridização. Colocar o antifade com DAPI e selar a lâmina. Incubar por dois dias.

h) Incubar em banho-maria a 42ºC na seguinte seqüência: 2 frascos com formamida a 50%, 2 frascos com 2SSC por 5 minutos em cada; 1 frasco de 4 tween (200 ml de 4SSC + 100µL tween) por 4 minutos.

A.2.8 Técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) com sonda telomérica

Técnica de acordo com o fabricante Oncor com adaptações. A marcação da sonda indica presença ou ausência da seqüência do telômero (TTAGGG)n.

Imergir a lâmina por 5 minutos em fixador 1:1 (1 ácido acético: 1 metanol).

Imergir a lâmina em pepsina (500 µL de pepsina em 50 µL de HCl 4,8 N) por 5 minutos.

Lavar 3 vezes as lâminas em solução de 2SSC durante 1 minuto cada.

Desidratar a lâmina contendo a preparação citológica em uma bateria de álcool (2x álcool 70% por 2 minutos, 2x álcool 90% por 2 minutos, e 1x álcool 100% por 4 minutos).

Incubar na estufa a 60ºC por uma hora.

Desnaturar a 70ºC a lâmina em uma solução de formamida a 70%, no banho-maria, por 45 segundos.

Desnaturar a sonda por 15 minutos a 70ºC (7µL da sonda telomérica com 6 µL de solução tampão).

Aplicar a sonda na lâmina e cobrir com uma lamínula de 24x50mm. Incubar em câmera úmida e escura na estufa a 37ºC durante 3 dias.

Incubar em banho-maria a 42ºC na seguinte seqüência: 2 frascos com formamida a 50%, 2 frascos com 2SSC por 5 minutos em cada; 1 frasco de 4 tween (200 ml de 4SSC + 100µL tween) por 4 minutos.

Retirar e lavar em 3 frascos de 4 tween durante 4 minutos cada, em temperatura ambiente.

Preparo da solução de detecção (200 µL de água + 0,4µL de solução de detecção – antidigoxigenina- Cy3). Pingar 200 µL em cada lâmina e cobrir com o parafilme, incubar em estufa durante 30 minutos. Retirar e lavar em 3 frascos de 4 tween durante 4 minutos cada, em temperatura ambiente. Colocar o antifade com DAPI e selar a lâmina.

A2.9 Técnicas de Análise e Captura de Imagem

As preparações citológicas serão analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II, com objetiva de aumento de 100 vezes, ocular com aumento de 10 vezes e optovar 1,25. Para observações do corante fluorescente CMA3, serão usados os filtros Zeiss BP 436, FT 460, LP 470; para DAPI os filtros serão Zeiss G 365, FT 395, e LP 420. As melhores metáfases serão digitalizadas com o auxílio da câmera Zeiss AxioCam MRm através do programa AxioVision 3.1 e as fotos então editadas com auxilio do programa Adobe Photoshop CS2.

A2.10 Medições e Disposições Cromossômicas

A montagem dos cariótipos será feita de acordo com a morfologia cromossômica (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos), dispostos aos pares e em ordem decrescente de tamanho.

Com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2 os cromossomos serão medidos, podendo assim determinar-se a razão entre os braços (RB), já que se tornará conhecido os comprimentos do braço curto (p) e do braço longo (q) de cada cromossomo e o comprimento relativo de cada par cromossômico (CR) em relação ao comprimento total do lote diploide (CTLD).

Os valores obtidos serão necessários para a classificação dos tipos cromossômicos, com base nos critérios propostos por Levan *et al.* (1964) e critérios adotados pelas literaturas que investigam o grupo de peixes.

Tabela 01: Tipos cromossômicos de acordo com a posição centromérica segundo Levan *et al.* (1964). Aqueles autores admitem chamar o cromossomo "telocêntrico" como "acrocêntrico", por ser esta designação muito popular na literatura.

Razão entre Braços	Classificação Cromossômica
1,00 – 1,70	Metacêntrico (m)
1,71 – 3,00	Submetacêntrico (sm)
3,01 – 7,00	Subtelocêntrico (st)
> 7,01	Telocêntrico (t) ou Acrocêntrico (a)

A2.11 - Técnica de "DNA barcoding" (Código de Barras das espécies):

Procedimento de Extração com o Kit Gen elute da Sigma, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante:

Picotar o tecido em pedaços bem pequenos (25mg). Transferir para um tubo de centrífuga.

Adicionar 180 µL de solução de lise (lise solution T) e mais 20 µL de proteinase K. Misturar em vórtex (2 ou 3 vezes) e incubar a amostra a 55 0C no banho – maria até a total digestão do tecido. O procedimento pode durar de 2 a 4 horas.

Tratamento opcional com a enzima RNASE: Adicionar 20 µL de solução de RNASE e incubar por 15 minutos, em temperatura ambiente.

Adicionar 200 µL solução de lise (Lise Solucion C) levar ao vórtex por 15 segundos, pois uma mistura homogênea é essencial para uma lise eficiente. Incubar por 10 minutos a 70 0C em banho – maria. Fazer a adição de 200 µL de etanol. Transferir para o tubo da coluna.

Coluna de Preparação: Colocar no eppendorf da coluna de anel vermelho 500 µL da solução da coluna de preparação (Column Preparation Solution) e adicionar a solução do DNA do passo anterior. Centrifugar por 1 minuto e descartar o líquido que passou pela coluna. Trocar o eppendorf e segue para o próximo passo.

Substituir o tubo. Adicionar 500 µL da solução de lavagem (Wash solution concentrate) e centrifugar por 1 minuto. Descartar o tubo e trocar novamente o eppendorf.

Adicionar 500 µL da solução de lavagem (Wash solution concentrate) e centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos. Pode centrifugar por mais 1 minuto. Máximo da velocidade para a evitar desperdícios.

Substituir um novo tubo e acrescentar 200 µL da solução de eluição (Elution Solution) diretamente no centro da coluna e centrifugar 6500 rpm por 1 minuto. Para aumentar a eficiência incubar 5 minutos na temperatura ambiente, podendo repetir este passo.

A amplificação do gene Cox1 será feita a partir de primers já descritos (F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'/

R1: 5'- AGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA – 3') e com objetivo de ter como produtos sequências em torno de 654 pares de bases (Ward *et al.*, 2005).

Reação da PCR para um volume final de 25 µL: 17,0 µL de água ultra pura (Milli-Q), 2,5 µL Tampão 10X, 1,75 µL de DNTP Mix, 1,0 µL de cada "primers" (iniciadores), 1,25 µL de MgCl2, 0,5 µL de Taq polimerase.

Em seguida, a reação é submetida ao termociclador nas seguintes condições:

Desnaturação Inicial	95°C	5 min	1X
Desnaturação	94°C	30 seg	
Anelamento	54°C	1 min	35X
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1X

Verificação do resultado da amplificação: Preparação de gel de agarose a 1% com aplicação de 3µL de reação e 1 µL de corante para eletroforese realizada nas condições de 130W/150 mA por 20 minutos. As bandas são esperadas em tamanho aproximado de 654 pares de bases.

Purificação das Amostras Amplificadas: O produto de PCR passará por reação de limpeza através do kit ExoSap-ITÒ (USB Corporation) seguindo o seguinte procedimento:

Limpeza com ExoSap-ITÒ (USB Corporation): Em um tubo eppendorf prepara-se uma reação contendo 5,0 µl do DNA amplificado juntamente com 2,0 µl da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Temp. Inicial	37ºC	15 min
Temp. Final	80ºC	15 min

m) Reação de PCR para Sequenciamento: A reação terá volume final de 9µl foi utilizado o Kit "Big DyeTM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems). O procedimento utilizado será o seguinte: Prepara-se uma

solução MIX, para cada uma das amostras contendo 2,0 µl de DNA (Amplificado e limpo pela ExoSap-IT), 2,0 µl do "primer", 2,0 µl solução Pré-MIX (nucleotídeos marcados com fluorescência) e 3,0 µl H2O autoclavada.

No termociclador será realizado o seguinte programa:

Desnaturação Inicial	96º C	2 min
Desnaturação	96°C	30 seg
Anelamento	50°C	15 seg
Extensão	60°C	4 min
Volta para o passo 2		30 vezes.

Limpeza do PCR de Sequenciamento: Adiciona-se em cada tubo 0,7 µl de EDTA (125mM), 0.7 µl de Acetato de Sódio (3 M). Homogeneizar e passar no spin brevemente. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por 15 min a 13000 rpm. Descartar o Etanol em papel toalha. Adicionar 24,5 µl de Etanol 70% Gelado. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm. Descartar o Etanol em papel toalha, podendo-se repetir estes últimos passos e fazer a lavagem com etanol 70%. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C, com o termociclador aberto. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

Sequenciamento de DNA: As sequências serão obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 do Laboratório de Estudos costeiros da Universidade Federal do Pará (Campus de Bragança (IECOS).

q) Análise dos Dados: As sequências obtidas serão editadas através dos programas ATGC (Genetyx Corporation) e Bioedit (Hall T.A., 1999) para a obtenção de sequências consenso, as quais serão posteriormente alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson *et al.*,1997) acoplado ao programa DAMBE (Xia e Xie, 2001). As sequências serão então analisadas no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) para a construção de dendrogramas, cujos parâmetros utilizados para verificar a divergência genética entre as sequências serão os recomendados na literatura para sequências barcoding, sendo utilizado o método de distância UPGMA e o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P). Os dendrogramas obtidos serão testados através do método bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1.000 pseudoréplicas.

A2.12- Obtenção de sondas de sequências repetitivas de DNA:

O isolamento das sequências repetitivas de DNA foi realizado a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Utilizando-se de iniciadores primers específicos para a sequência alvo, a ser amplificada, na presença do DNA molde. Os retrotransposons Rex1 e Rex3 foram amplificados e identificados no DNA genômico de Rhamphichthys rostratus. Utilizando as sequências REX1-f (5' -TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3') e REX1-r (5' -TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3'), e REX3f (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e REX3r (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3) formando bandas de DNA de 560 e 400 pares de bases, respectivamente (Volff *et al.*, 1999). Esses primers se mostram bem eficientes e já foram utilizados em diferentes grupos de peixes (Ozouf-Coastaz *et al.*, 2004; Capriglione *et al.*, 2002).

A sequência parcial do transposons Mariner foi amplificada com os iniciadores MAR-188f (5'- ATC TGR AGC TAT AAA TCA CT- 3') e MAR-215r (5'- CAA AGA TGT CCT TGG GTG TG-3') descritos por Lampe *et al.* (2003).

O gene 5s DNAr também será amplificado a partir de iniciadores já descritos e depositados no Genbank (X58367.1, FJ 572051.1, FJ 572052.1, X58365.1), através das reações de PCR utilizando os primers F (5'- GCC ACA CCA CCC CTG AAC AC -3') e R (5'- GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC-3').

As reações de PCR serão feitas de forma padronizada, em um volume final de 22 µl, de acordo com as concentrações a seguir: 1 µl de DNA (40ng/ µl), 2,5 µl de tampão 10X, 2,5 µl de DNTPs, 0,75 µl de MgCl2 (50 mM), 1,25 µl de cada primers forword e reverse (10 mM), 0,25 µl de Taq polimerase (5unidades/ µl) e 12,50 µl de água autoclavada.

As condições da reação no termociclador são as seguintes:

Desnaturação Inicial	95º C	3 min
Desnaturação	95°C	1 seg
Anelamento	Temp. diversas °C	1 min
Extensão	72°C	2 min
Volta para o passo 2		30 vezes.
Ciclo único	72 °C	5 min
Temperatura final	4°C	constante.

As temperaturas de anelamento são variáveis, para cada sequência alvo, pois seus iniciadores são específicos, sendo utilizadas 45°C para o transposons Mariner, 55°C para o DNAr, 51°C para as sequências repetidas de REX1, e 53°C para REX3.

O produto do PCR foi marcado por Nick translation com digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannhein,Germany). As sondas foram detectadas com anti-digoxigenina-FITC. As técnicas de FISH utilizadas já foram descritas anteriormente.