

**CARLA DE ANDRADE VITORINO**

**O USO DE MARCADORES CITOGENÉTICOS BÁSICOS E  
MOLECULARES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
POPULAÇÃO DE *Hoplias malabaricus***

**NOVA XAVANTINA**

**2010**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLÓGICAS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE NOVA XAVANTINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO**

Carla de Andrade Vitorino

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Venere

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação do Instituto de Ciências Naturais e Tecnológicas da UNEMAT – Campus de Nova Xavantina para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Nova Xavantina

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V845u Vitorino, Carla de Andrade.

O uso de marcadores citogenéticos básicos moleculares para  
Caracterização de uma população de *Hoplias malabaricus* /  
Carla de Andrade Vitorino. Nova Xavantina : UNEMAT, 2010.  
xiii, 69 f., (algumas color.).

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Mato  
Grosso. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação,  
2010.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Vênere

1. Peixes. 2. Citogenética. 3. Cariomorfos. 4. Araguaia.  
I. Título.

CDU: 597.551.3(043.3)

**CARLA DE ANDRADE VITORINO**

**O uso de marcadores citogenéticos básicos e moleculares para a caracterização de uma população de *Hoplias malabaricus***

Essa dissertação foi julgada e aprovada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Nova Xavantina, 26 de Março de 2010.

**Banca examinadora**



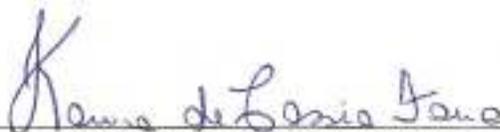
---

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere  
Universidade Federal do Mato Grosso  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
Universidade Federal de São Carlos



---

Profª. Dra Karina de Cassia Faria  
Universidade do Estado de Mato Grosso

Nova Xavantina  
MATO GROSSO, BRASIL  
2010

Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

Dedico este trabalho...

...aos meus pais, Sebastião e Laércia, por sempre me incentivarem durante essa caminhada e por me ensinarem a importância da construção dos meus próprios valores.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela paz, segurança, conforto e ensinamento nos momentos de desequilíbrio espiritual, cansaço e angústia.

À Universidade do Estado de Mato Grosso, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Grupo de Estudos em Peixes do Médio Araguaia(GEPEMA/UFMT), por fornecer as condições necessárias para a elaboração dessa dissertação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Venere pelo apoio, incentivo, orientação e por sempre estar disposto a partilhar os seus valiosos conhecimentos. Agradeço especialmente pela amizade, paciência, pela confiança em mim depositada e por ter me apresentado à citogenética, desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Issakar Lima Souza pela orientação e valiosa colaboração neste trabalho.

Ao prof. Dr. Orlando Moreira Filho, por aceitar o convite para membro da banca e se deslocar de tão longe, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina de Cássia Faria por se disponibilizar a corrigir a dissertação em apenas um dia e pelas sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. César Martins por disponibilizar o uso do laboratório de Genômica Integrativa da UNESP de Botucatu, e pela oportunidade de aprender novas técnicas.

Ao Guilherme Targino por ter me ensinado a técnica de FISH.

À Welley Teixeira e ao Roberto Laridondo Lui pelas sugestões fundamentais para a realização da FISH.

Aos professores do curso de pós-graduação em Ecologia e Conservação por contribuírem para a minha formação. E, aos colegas do mestrado, Henrique, Divino, Josenilton, Moisés e Elias, pelos momentos que passamos juntos.

Aos amigos do laboratório de Citogenética de Peixes, Leonardo Nazário Moraes e Laura Siqueira Gardinal, pela amizade e por ajudarem na realização dessa dissertação.

A minha irmã Camila, que sempre torceu por mim.

Às minhas primas Milene e Letícia, pela amizade, companheirismo e pelas caronas.

À minha prima Gloria Donizete por sempre me acolher em sua casa durante o tempo das disciplinas em Nova Xavantina, pelos conselhos, incentivo, amizade e pelas conversas que me faziam esquecer a agitação do mestrado.

Aos meus amigos – Karine, Cássia, Ismael, Larissa e Vagner, pela amizade, conselhos e pelos momentos de descontração. Em especial, à Michele Novaes Ribeiro, por ser minha companheira de viagem, no alojamento e principalmente pelos conselhos e amizade; e à Uly Matilde Pozzobom Costa, pela amizade e companhia em todas as disciplinas.

À uma pessoa muito especial, Rodrigo Ramos, pelo carinho, paciência, incentivo, pelos momentos de alegria e por me auxiliar nos momentos em que mais necessitei.

À toda minha família, em especial o meu avô, José Ferreira de Andrade e minha tia Rosa, pelos conselhos e incentivos durante a minha formação.

Aos meus pais, Sebastião P. Vitorino e Laércia Ferreira de Andrade, por serem o meu alicerce, me incentivarem e me apoiarem nesse caminho, pelo amor incondicional e pelos outros sentimentos nobres fundamentais para que minha jornada fosse concluída.

## SUMÁRIO

Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Lista de abreviações.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de figuras.....	XII
Introdução Geral.....	01
Capítulo I – O uso de técnicas citogenéticas básicas e moleculares para a caracterização de uma população de <i>Hoplias malabaricus</i> (traíra).....	03
I. Introdução.....	04
I.1 – Considerações iniciais.....	04
I.2 – Marcadores cromossômicos.....	05
I.2.1 - Marcadores cromossômicos mais utilizados.....	08
I.3 – Estado atual dos estudos cromossômicos em <i>Hoplias malabaricus</i> .....	09
II. Objetivos.....	15
III. Material e Métodos.....	16
III.1. Local de Coleta.....	16
III.2. Métodos.....	16
IV. Resultados.....	18
V. Discussão.....	27
VII. Referências bibliográficas.....	33
Capítulo II – Citogeografia: <i>Hoplias malabaricus</i> , um modelo a ser explorado.....	34
I. Introdução.....	35
II. Material e Métodos.....	37
III. Resultados.....	39
IV. Discussão.....	47
V. Referências bibliográficas.....	50
Conclusões Gerais.....	51
Bibliografia Geral.....	52
Anexos.....	64
1. Preparação de cromossômicos mitóticos (Técnica Convencional).....	64
2. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).....	65
3. Técnica para detecção da heterocromatina constitutiva .....	65
4. Técnica para coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina A <sub>3</sub> .....	66
5. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	66

## RESUMO

Peixes do gênero *Hoplias* possuem ampla distribuição geográfica e têm demonstrado alta diversidade cariotípica. Especialmente *H. malabaricus* (traíras), revela variações numéricas e estruturais, com ocorrência de diferentes sistemas de cromossomos sexuais, o que permitiu, até o presente, a identificação de sete cariomorfos distintos. Estudos prévios realizados no médio Araguaia revelaram que três cariomorfos ocorrem na região, sendo um deles ainda não descrito para a espécie. Diante do exposto, objetivou-se aplicar técnicas citogenéticas básicas e moleculares (FISH) para melhor caracterização desse último cariomorfo. Os exemplares foram coletados numa lagoa isolada, em Pontal do Araguaia (MT) e transportados para o Laboratório de Ictiologia/GEPEMA – UFMT, onde foram submetidos às técnicas rotineiras para análise citogenética em peixes. A detecção das Ag-RONs, das bandas C e das regiões ricas em pares de bases GC foi realizada através da coloração por nitrato de prata, do tratamento com hidróxido de bário e com a coloração com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>, respectivamente. A hibridação com as sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, 5SHindIII-DNA foi realizada pela técnica de FISH. Os exemplares apresentaram 2n=40 cromossomos (24 m+16 sm), com possível ocorrência de um mecanismo cromossômico de determinação sexual. Foram observadas Ag-RONs em até sete cromossomos e presença de marcações biteloméricas em um par. Os blocos de heterocromatina foram localizados nas regiões centroméricas e teloméricas da maioria dos cromossomos, com uma variação evidente nos blocos heterocromáticos pericentroméricos do braço curto do par sm nº 14. Esses blocos podem aparecer grandes ou pequenos em dose dupla e em situação de heterozigose. As Ag-RONs sempre se apresentaram em posições aparentemente coincidentes com blocos de heterocromatina constitutiva CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, e essas posições foram confirmadas pela hibridação *in situ*. O DNA r 5S encontra-se na posição intersticial de um par sm nº 19. O DNA satélite 5SHindIII-DNA foi mapeado na região centromérica de 24 cromossomos. De maneira geral pode-se afirmar que o cariótipo estudado apresenta características peculiares suficientes que o distingue dos demais já descritos, permitindo que a população estudada possa ser considerada como uma unidade evolutiva independente. Os resultados obtidos, juntamente com todos os dados de literatura, reforçam a hipótese de que o grupo representa várias espécies crípticas, que possuem característica citogenéticas próprias.

PALAVRAS-CHAVE: peixes, citogenética, cariomorfos, Araguaia.

## ABSTRACT

The genus *Hoplias* is widely distributed and has shown high diversity of karyotypes, especially the species *Hoplias malabaricus* (traíras), which has numerical and structural variations with diploid number and the presence of different systems of sex chromosomes, which allowed up to now, the identification of seven distinct karyomorphs. Studies in the Araguaia River revealed three different karyomorphs for this species, one of these karyomorphs is not observed for any other population of *H. malabaricus*. Thus, this study aimed to apply more refined techniques to better characterize cytogenetically this population. The specimens were collected in the municipality of Pontal do Araguaia (MT) and transported to the Laboratory of Ichthyology / GEPEMA - UFMT, where they were submitted to routine techniques for cytogenetic analysis in fish. The detection of Ag-RONs, of the C bands and of the regions rich in GC base pairs was performed through staining by silver nitrate, treatment with barium hydroxide and staining with fluorochrome Chromomycin A<sub>3</sub>, respectively. Hybridization with probes of 18S rDNA, 5S rDNA, and 5S*Hind*III-DNA was conducted using the technique of FISH. The specimens showed a diploid number of 40 chromosomes (22 m+18 sm), without apparent mechanism of chromosomal sex determination. Multiple Ag-NORs were observed, with the occurrence of up to seven chromosomes and the presence of sites in both telomeres in a pair of chromosomes. The constitutive heterochromatin was located in the centromeric and telomeric regions of most chromosomes, with an evident variation in pair14. The Ag-NORs always occur in positions of apparently coincident with the bands of constitutive heterochromatin rich in GC base pairs, and these positions were confirmed by hybridization *in situ*. The 5S rDNA is in the interstitial position of pair sm 19. The satellite DNA 5S*Hind*III was mapped in the centromeric region of 24 chromosomes. Some features found are very similar to those described for the cariomorfo C, such as the diploid number and the absence of mechanism of sex chromosomes. However, the karyotype that was studied had sufficient peculiar characteristics that distinguish it from the standard cariomorfo C, allowing the population to be regarded as an independent evolutionary unit. The results, together with all the cytogenetic data available for the group *Hoplias malabaricus*, suggests that there is group of several cryptic species, which have characteristic cytogenetic own.

KEY WORDS: fishes, cytogenetic, karyomorphs, Araguaia.

## LISTA DE ABREVIACÕES

AgNO<sub>3</sub> – Nitrato de prata

AT – Adenina e timina

CMA<sub>3</sub> – Cromomicina A<sub>3</sub>

DAPI – 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAr – Ácido desoxirribonucléico ribossomal

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente

GC – Guanina e citosina

m – Metacêntrico

RNA – Ácido ribonucléico

RONs – Regiões organizadoras de nucléolos

sm – Submetacêntrico

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Página
Tabela I. Medidas cromossômicas para os exemplares de <i>H. malabaricus</i> .	21
CAPÍTULO II	
Tabela I. Locais de coleta de <i>Hoplias malabaricus</i> e seus respectivos citótipos (Dados obtidos de BERTOLLO <i>et al.</i> , 2000, com novas inserções de textos recentes).	44

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Página
<b>Figura 01.</b> Frequências dos números diplóides da população de <i>Hoplias malabaricus</i> em estudo	20
<b>Figura 02.</b> Cariótipo dos exemplares de <i>Hoplias malabaricus</i> , coletados na Lagoa da Chácara Joyce, no município de Pontal do Araguaia (MT). (A) Coloração com Giemsa. (B) Coloração com nitrato de prata. (C) Padrão de bandamento C.	22
<b>Figura 03.</b> Células coradas com nitrato de prata, mostrando a presença de (A) oito nucléolos e (B) sete nucléolos.	23
<b>Figura 04.</b> Coloração com Cromomicina A <sub>3</sub> , mostrando o polimorfismo existente em um par de cromossomos. Em (A) há a presença apenas de blocos heterocromático GC ricos pequenos, em (B) há apenas um cromossomo portador do bloco heterocromático GC rico grande e em (C) pode-se observar a presença do par com o bloco.	23
<b>Figura 05.</b> Cariótipo de <i>H. malabaricus</i> obtidos após a coloração com o fluorocromo Cromomicina A <sub>3</sub> . Os blocos mais brilhantes se referem a regiões de heterocromatina GC-ricas.	24
<b>Figura 06.</b> Cariótipos de fêmeas e machos após a aplicação da técnica de FISH (Fluorescent <i>in situ</i> hibridization) com as sondas de rDNA 18S, 5SHindIII-DNA e Double-FISH com as sondas 5SHindIII-DNA + rDNA 5S, em <i>Hoplias malabaricus</i> .	25
<b>Figura 07.</b> Idiograma representativo do lote haplóide para a população de <i>Hoplias malabaricus</i> . A localização do rDNA 18S, da sequência 5SHindIII-DNA e do rDNA 5S estão representadas, respectivamente, pelos Retângulos com bolinhas pretas, barras verticais e retângulo preto.	26

## CAPÍTULO II

- Figura 1** - Exemplar da espécie *Hoplias malabaricus*. 38
- Figura 2.** Local de coleta. No destaque observa-se a lagoa onde os animais foram capturados e período de seca. 38
- Figura 3.** Cariótipos obtidos para fêmeas e machos de *Hoplias malabaricus* coletados na Lagoa da Chácara Joyce, município de Pontal do Araguaia, MT. 40
- Figura 4.** Metáfases de *Hoplias malabaricus*, A) mostrando os cromossomos portadores de AgRONS teloméricas, biteloméricas e pericentroméricas (setas); B, C e D) banda C, as setas indicam os blocos de heterocromatina que apresentam variações intra-individuais. 41
- Figura 5.** Metáfases de *Hoplias malabaricus*, (a e b) após coloração com cromomicina mostrando os blocos heterocromáticos  $CMA_3^+$ . As setas indicam os blocos descritos para o par nº14. (c) metáfase após FISH com sondas de rDNA 18S (setas indicam os cromossomos portadores de RONS). (d) Double FISH. As cabeças de setas mostram os cromossomos portadores de sítios de rDNA 5S. As regiões pericentromérica em vermelho correspondem aos sítios 5S*HyndIII*. 42
- Figura 6.** Distribuição dos diferentes cariomorfos descritos para *H. malabaricus*. 43

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Erythrinidae compreende alguns peixes de água doce Neotropical com uma ampla distribuição na América do Sul (BRITISK *et al.* 1986). De acordo com Menezes (1972), esta família é encontrada em todo o Brasil e está presente em todas as quatro grandes bacias fluviais brasileiras, Amazonas, Paraná, São Francisco e do Leste. Esta família consiste de três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*, todos eles presentes na América do Sul.

O gênero *Hoplias* engloba os peixes conhecidos como traíras e trairões. *Hoplias malabaricus* possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e apresenta alta diversidade cariotípica. Embora a espécie *Hoplias malabaricus* (traíras) seja considerada uma única espécie nominal, ela apresenta citótipos diversificados entre populações isoladas nas diferentes bacias hidrográficas, ou até mesmo entre populações de distribuição simpátrica cujos exemplares podem ser coletados em sintopia (BERTOLLO *et al.*, 1997 a). Análises citogenéticas convencionais nesse complexo de espécies têm demonstrado ampla diversidade cromossômica, com variações numéricas ( $2n=39$  a  $2n=42$ ) e estruturais, e diferentes sistemas de cromossomos sexuais, o que permitiu, até o presente, a identificação de sete citótipos distintos, os quais foram denominados A, B, C, D, E, F e G (BERTOLLO *et al.*, 2000).

As técnicas convencionais, como coloração Giemsa, bandamento C, impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RONs) e o uso de fluorocromos base-específicos (Cromomicina A<sub>3</sub>, Mitramicina e DAPI), são utilizadas nos principais estudos realizados pela citogenética de peixes. Nas últimas décadas a citogenética também se uniu a técnicas de manipulação do material genético associada à detecção de seqüências específicas de DNA, surgindo assim a Citogenética Molecular, sendo a FISH (fluorescent *in situ* hybridization) a técnica mais utilizada em peixes (ARTONI *et al.*, 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de aplicar técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, mais específicas para caracterizar uma população de *H. malabaricus* da região do Médio Rio Araguaia, com a finalidade de verificar e de se confirmar a existência de mais uma unidade evolutiva independente nessa região sugerida por Vitorino *et al.* (2008).

Para uma melhor análise e compreensão dos resultados obtidos, o presente trabalho foi então estruturado em dois capítulos. O primeiro (Capítulo I: O uso de técnicas

citogenéticas básicas e moleculares para a caracterização de uma população de *Hoplias malabaricus* - traíra), trata da caracterização citogenética de uma população de *Hoplias malabaricus* e descrição de mais uma forma cariotípica para esse grupo. O segundo capítulo (Capítulo II: Citogeografia: *Hoplias malabaricus*, um modelo a ser explorado), se preocupou em discutir os dados com uma abordagem mais ecológica, utilizando a citogenética como uma ferramenta para o entendimento da história evolutiva e da atual distribuição do complexo de espécies *Hoplias malabaricus*.

## CAPITULO I

**O USO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS BÁSICAS E MOLECULARES  
PARA A CARACTERIZAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE *Hoplias malabaricus*  
(TRAÍRA) DO MÉDIO ARAGUAIA**

## I. Introdução

### I.1 – Considerações iniciais

A citogenética de peixes neotropicais é uma área em franca expansão e tem acumulado dados que permitem estabelecer tendências evolutivas entre as diferentes famílias. Entretanto, o conhecimento citogenético dessa ictiofauna é ainda restrito para vários grupos (OLIVEIRA & FORESTI, 1994). Segundo Gold *et al.* (1990) menos de 10% das mais de 25.000 espécies de peixes existentes possuem o número de cromossomos e/ou cariótipos conhecidos.

As ordens de peixes primárias de água doce mais representativas na região neotropical são os Characiformes e Siluriformes, vulgarmente chamados de peixes de escama e de couro, respectivamente (LOWE-MCCONNELL, 1999), os quais mostram grande variabilidade cariotípica. De maneira geral, algumas famílias se apresentam bem conservadas cariotipicamente, enquanto que outras são bastante heterogêneas (ARTONI *et al.*, 2000, 1999; GALETTI Jr. *et al.*, 1994; VENERE & GALETTI Jr., entre outros).

Especificamente entre os Characiformes podem ser verificados dois padrões de diversificação cromossômica bem distintos: o primeiro consiste nos grupos, tais como *Hoplias* (Erythrinidae) e *Astyanax* (Characidae), que apresentam um padrão heterogêneo de diversificação cromossômica, caracterizado pela existência de extensa variação numérica e estrutural dos cromossomos. Num segundo grupo encontram-se as famílias Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, Hemiodontidae e Parodontidae, as quais mostram uma acentuada constância na macroestrutura cariotípica, com  $2n=54$  cromossomos com dois braços (GALETTI Jr. *et al.*, 1994). Diante das informações disponíveis na literatura, podemos afirmar que esses diferentes padrões de diversificação cariotípica estão intimamente relacionados ao comportamento dos diferentes grupos, ou seja, aqueles grupos de peixes que apresentam alta vagilidade (alta capacidade de dispersão, como são os peixes tipicamente migradores) geralmente são caracterizados por padrões cariotípicos bastante conservados. Por outro lado, os grupos que formam pequenas populações, que vivem em ambientes restritos e que não apresentam comportamento migratório, como são as traíras, são aqueles que possuem cariótipos diversos e particulares, muitas vezes restritos a pequenas áreas de distribuição (OLIVEIRA *et al.*, 1988).

Apesar de várias espécies contarem com grande quantidade de informações disponíveis na literatura, pode-se afirmar que o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda reduzido quando comparado ao de mamíferos e outros grupos de seres vivos. A maior dificuldade na análise dos cromossomos de peixes se deve, principalmente, ao seu reduzido tamanho e à falta de resolução de algumas técnicas de bandamento (BRUM, 1995). No entanto, quase todas as famílias de peixes neotropicais possuem espécies com alguma informação cromossômica, esses dados são de grande importância, pois contribuem para o conhecimento da biologia, sistemática e evolução desses grupos (ARTONI *et al.* 2000).

## **I. 2 Marcadores cromossômicos**

Após a segunda metade do século XIX algumas espécies de animais e vegetais puderam ser classificadas de acordo com suas características cromossômicas. Entretanto, a citogenética só começou a ser considerada como uma ferramenta da taxonomia quando foram comparados o número e a morfologia dos cromossomos entre diferentes espécies ou entre populações da mesma espécie (BERTOLLO *et al.*, 1978). O primeiro a propor a utilização de dados cariotípicos para identificar espécies e para elaborar padrões de relacionamento ou filogenias foi Mathey (1949 *apud* SCZEPANSKI, 2008) no primeiro trabalho de revisão de dados cromossômicos de vertebrados.

As técnicas de bandeamento em cromossomos mitóticos de anfíbios, introduzidas na década de 1970 por Schmid (SCHIMID, 1978; SCHIMID, 1980a; SCHIMID, 1980b; SCHIMID & GUTTENBACH, 1988; SCHIMID & KRONE, 1976), deram início a uma nova fase nos estudos cromossômicos em pequenos vertebrados. Os padrões de bandas observados para cada espécie passaram então a permitir relacionar alguns grupos, ampliando o entendimento sobre a estrutura dos cromossomos eucarióticos e fornecendo importantes dados para a compreensão molecular da organização dos cromossomos de vertebrados (MORAES, 2007).

A citogenética juntamente com a taxonomia (Citotaxonomia) se tornou uma ferramenta de fundamental importância para o entendimento de peixes neotropicais, fundamentalmente no que se diz respeito a grupos taxonomicamente mal definidos (BERTOLLO *et al.*, 1986) como são os casos dos Erythrinidae, Characidae, Loricariidae, entre outros grupos.

Os principais estudos realizados pela citotaxonomia de peixes têm sido feitos com o uso de técnicas da citogenética convencional, como coloração com Giemsa, bandamento C, impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RONs) e o uso de fluorocromos base-específicos (Cromomicina A<sub>3</sub>, Mitramicina e DAPI). O bandamento G, bastante informativo em mamíferos, não é muito utilizado, uma vez que bandamentos longitudinais não são tão fáceis de serem obtidos em cromossomos de peixes (ARTONI *et al.*, 2000).

A visualização dos cromossomos pela coloração com Giemsa permite a determinação do número diplóide e da constituição cariotípica de uma espécie, abrindo assim um importante caminho para a comparação interespecífica. Os cromossomos portadores das Ag- RONS, podem ser localizados de maneira rápida e fácil pelo método de coloração com o nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Porém a coloração com AgNO<sub>3</sub> permite apenas a localização das RONS ativas antes da divisão celular. O nitrato de prata parece ser responsável pela coloração de uma proteína não-histona ácida (nucleolina, também chamada de proteína C<sub>23</sub>) presente nas RONS ativas durante a interfase no momento da fixação das células. Essa técnica deve ser considerada como um método indireto para a localização das RONS, uma vez que não há associação direta entre a coloração mais escura resultante do nitrato de prata e os rDNAs propriamente ditos (MILLER *et al.*, 1976; NIRCHIO & OLIVEIRA, 2006).

A coloração com corantes fluorescentes como a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), Mitramicina (MM), Quinacrina, DAPI entre outros, permitem identificar regiões ricas em pares de bases AT ou GC. Alguns autores sugerem também que alguns desses fluorocromos como, por exemplo, a CMA<sub>3</sub> e a MM, também, podem ser utilizados para a identificação das RONS independentemente de sua atividade (PHILLIPS & REED, 1996). De acordo com esses autores, a localização das RONS pelos fluorocromos citados se deve a ocorrência de grandes quantidades de pares de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais (AMEMIYA & GOLD, 1986). Entretanto, existem alguns casos nos peixes em que a CMA<sub>3</sub> evidencia sítios adicionais, que não possuem rDNA, levando a resultados falsos positivos (GALETTI Jr. & MARTINS, 2004; PHILLIPS & REED, 1996).

A observação das RONS permite detectar grupos em que sua distribuição se dá em apenas um par de cromossomos e grupos com múltiplos sítios desses elementos (RONS múltiplas). Schmid (1980a) sugere que os cariótipos com RONS simples sejam primitivos em relação a cariótipos com RONS múltiplas. Estes sítios são importantes

marcadores cromossômicos, uma vez que seu número e localização são característicos de espécies e de populações, embora variabilidades intra e interindividuais sejam observadas em populações de vários organismos (LOURENÇO *et al.* 1998).

Outro recurso bastante utilizado para caracterização cariotípica é a técnica de Bandamento C, que consiste numa remoção diferencial de DNA da região eucromática após o tratamento com ácido, base e solução salina, enquanto que a região heterocromática permanece aparentemente intacta (SUMNER, 1972). A eucromatina é composta pela maioria dos genes estruturais e sequências de DNA de cópia única; enquanto que a heterocromatina é caracterizada pela ausência de atividade gênica, pois se encontra constantemente condensada e é composta por sequências de DNA altamente repetidas, geralmente concentradas em blocos nas regiões pericentroméricas ou teloméricas dos cromossomos (GUERRA, 1988). A função da heterocromatina ainda não é bem conhecida, entretanto, alguns estudos demonstram que essas porções de DNA repetitivo são essenciais para o comportamento cromossômico próprio (WALLRATH, 1998).

De acordo com John (1988, *apud* MARGARIDO, 1995) a heterocromatina não possui funções propriamente ditas, mas sim efeitos nas células somáticas, como por exemplo, auxílio na associação de heterocromatinas entre cromossomos não homólogos; efeitos de posição que podem afetar a expressão gênica e efeito nucleotípico, ou seja, a quantidade de DNA influenciando no tamanho da célula e no tempo de divisão celular e efeito sobre o comportamento do centrômero. Nesse sentido KIPLING & WARBURTON (1997), descrevem o papel da proteína CENP-B que se encaixa em sequências específicas de DNA satélite do centrômero (regiões heterocromáticas), de vários grupos de mamíferos, garantindo assim a formação do complexo protéico do cinetócoro.

Atualmente a citogenética também se uniu às técnicas de manipulação do material genético associadas à detecção de sequências específicas de DNA nos cromossomos (ARTONI *et al.*, 2000). Nesse contexto, a técnica de FISH (fluorescent *in situ* hybridization), tem possibilitado uma melhor caracterização das espécies em estudo por permitir um mapeamento físico de sequências de DNA conhecidas ao longo dos cromossomos. Essa técnica consiste na inclusão de uma sonda de DNA ou RNA, no DNA da espécie em estudo, o qual possui uma sequência complementar de nucleotídeos (sequência-alvo), que posteriormente será visualizada através da aplicação de um corante fluorescente (GUERRA, 2004). A FISH tem sido uma ferramenta útil para

obtenção de dados importantes para o entendimento da distribuição, por exemplo, dos cístrons ribossomais (DNAr) nos cromossomos, constituindo assim um método mais sensível para o mapeamento cromossômico físico (SCZEPANSKI, 2008).

Além do DNAr, a técnica FISH, também tem sido muito utilizada para a localização de sequências repetitivas centroméricas e teloméricas de várias espécies de peixes, localização de outras sequências repetidas em tandem nos blocos de heterocromatina, localização de sequências sexo-específicas, localização de sequências repetitivas dispersas, além de outros tipos de sequências dentro do genoma, como, genes específicos, braços cromossômicos e cromossomos inteiros (PHILLIPS & REED, 1996; PHILLIPS, 2001).

### I.2.1 Marcadores cromossômicos mais utilizados

Os genes ribossomais, nos eucariotos superiores, são divididos em duas famílias multigênicas, a primeira é representada pelo DNA ribossômico 45S, que consiste na unidade transcricional que codifica os rRNAs 18S, 5.8S e 26S/28S e outra representada pelo rDNA 5S que codifica o rRNA 5S (MARTINS e GALETTI Jr., 2001b). O rDNA 45S está relacionado as sequências formadoras das RONS e tem sido muito estudado através do tratamento com nitrato de prata, coloração com fluorocromos e também pode ser localizado pela hibridação *in situ*, onde a sonda mais comumente utilizada é parte do rDNA 18S.

O rDNA 5S não está relacionado a organização nucleolar e só pode ser localizado pela hibridação *in situ* (GALETTI Jr. & MARTINS, 2004). Consiste em sequências codificantes de 120 pares de bases separadas umas das outras por espaçadores não transcritos (NTS) que mostram acentuada variação no comprimento, sendo altamente conservado mesmo entre taxa não-relacionados, tanto no comprimento quanto na sequência de nucleotídeos (MARTINS & GALETTI Jr., 2001b).

Vários grupos de peixes tem apresentado acentuada variabilidade em relação à localização dos sítios cromossômicos de rDNA 45S, enquanto que os sítios de rDNA 5S apresentam-se mais conservados. Segundo Galetti Jr. & Martins (2004) estas ocorrências podem estar relacionadas à localização cromossômica dos rDNAs, pois os locos de rDNAs 45S estão muitas vezes localizados em posição terminal e os locos de rDNA 5S estão localizados em posição intersticial nos cromossomos, o que sugere que o rDNA 5S pode estar protegido de eventos evolutivos (rearranjos cromossômicos).

As repetições do rDNA 5S podem se apresentar de forma dinâmica. Por exemplo, no genoma da espécie *Hoplias malabaricus* foram isoladas e caracterizadas duas famílias repetidas em tandem, as quais foram denominadas de rDNA 5S-verdadeiro e rDNA 5S-variante, posteriormente denominado de 5S-*Hind*III (MARTINS *et al.*, 2006). As repetições de rDNA 5S-verdadeiro contém as regiões que codificam o rDNA 5S completa e a sequência rDNA 5S-*Hind*III contém uma região codificante truncada para o rDNA 5S. A sequência 5S-*Hind*III possui um microsatélite TAAA, que é similar a um curto fragmento rico em adenina identificado no DNA satélite centromérico de diferentes espécies de peixes, que tem se propagado na região centromérica de vários cromossomos e, devido a um possível papel na estrutura e função do centrômero, tem sido favorecida durante a evolução (MARTINS, 2007).

As sequências repetitivas centromérica não são sempre conservadas entre os vertebrados, servindo como excelentes marcadores cromossômicos (PHILLIPS & REED, 1996). Além disso, os estudos sobre as sequências repetitivas podem fornecer pistas interessantes para a compreensão da estruturação do genoma e evolução (MARTINS, 2007).

### **I.3 Estado atual dos estudos cromossômicos em *Hoplias malabaricus*:**

Desde o início dos estudos citogenéticos em *Hoplias malabaricus*, várias formas cariotípicas distintas foram detectadas nesses peixes nas diferentes bacias hidrográficas onde foram estudados (BERTOLLO *et al.*, 1978; BERTOLLO *et al.*, 1979; BERTOLLO *et al.*, 1986). Até o presente, sete cariomorfos já foram identificados, demonstrando uma estrutura cariotípica diversificada com números diplóides variando de 39 a 42 cromossomos (BERTOLLO *et al.*, 2000).

O primeiro estudo citogenético realizado em *Hoplias malabaricus* já demonstrou uma grande diversidade cariotípica. Bertollo (1978 *apud* BERTOLLO *et al.* 1978) observou diferenças entre quatro populações de *H. malabaricus* que, de maneira resumida, são as seguintes: na população da Represa do Lobo (SP) as fêmeas apresentaram  $2n=40$  cromossomos e os machos  $2n=39$  cromossomos, no rio Aripuanã (MT) as fêmeas possuem  $2n=40$  cromossomos e os machos  $2n=41$  cromossomos, no Vale do Rio Doce (MG) e no rio Juquiá (SP) machos e fêmeas apresentaram  $2n=42$  cromossomos.

Apesar de possuírem o mesmo número diplóide, diferenças estruturais foram verificadas entre as populações pertencentes ao Vale do Rio Doce e ao Rio Juquiá. A população do Vale do Rio Doce apresenta 12 pares metacêntricos, 8 submetacêntricos e 1 par subtelocêntrico nas fêmeas e os machos possuem o subtelocêntrico univalente e um pequeno submetacêntrico adicional. A população do Rio Juquiá apresenta 15 pares metacêntricos e 6 pares submetacêntricos nas fêmeas e os machos apresentam um cromossomo submetacêntrico (número 5) e um metacêntrico pequeno (BERTOLLO *et al.* 1979). Ambas apresentaram número diplóide de 42 cromossomos, com número fundamental igual a 84 e mecanismo de determinação sexual do tipo XX/XY.

Esse sistema de cromossomos sexuais foi confirmado por Born e Bertollo (2000), sendo o cromossomo X caracterizado pela presença de um grande bloco de heterocromatina na região distal do braço longo, a RON é sempre ativa neste cromossomo e foi identificada com coloração através do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e com a hibridação de sondas de rDNA 18S. Apenas um cromossomo com essas características foi observado no cariótipo do macho.

No estudo realizado por Bertollo *et al.* (1983) com exemplares provenientes da Represa do Lobo (Estado de São Paulo, Brasil), mais uma forma cariotípica foi descrita para *Hoplias malabaricus*, caracterizada por um número diplóide de 40 cromossomos nas fêmeas e 39 cromossomos nos machos, indicando a presença de um mecanismo múltiplo de determinação sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ , o qual foi confirmado por Dergam e Bertollo (1990). Segundo Bertollo *et al.* (1997b) o cromossomo Y (um dos maiores metacêntricos) deve ter surgido de uma translocação entre dois cromossomos de dois braços ( $X_1$  e  $X_2$ ). Tal conclusão foi embasada na observação do padrão de bandas C e G desses cromossomos. A presença desse sistema múltiplo de cromossomos sexuais foi re-analisada e confirmada por Bertollo & Mestriner (1998) através do estudo do comportamento meiótico de exemplares possuidores desses cariomorfos.

Bertollo *et al.* (1983) detectaram uma nova forma cariotípica para *Hoplias*, na qual as fêmeas possuem número diplóide igual a 40 cromossomos e os machos 41, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais do tipo  $XX/XY_1Y_2$ . O cromossomo X (maior metacêntrico), encontrado em dose dupla nas fêmeas, aparece sozinho nos machos. Além disso, nos machos, ocorre um submetacêntrico e um acrocêntrico que não são observados nas fêmeas.

Outra forma cariotípica com número diplóide igual a 40 cromossomos metacêntricos e submetacêntricos para fêmeas e machos, sem aparente mecanismo de

determinação sexual em nível cromossômico foi encontrada por Bertollo *et al.* (1986) no Rio Miranda (MS) e no Rio Negro (AM); por Lopes & Fenocchio (1994) no Rio Paraná (Misiones, Argentina); e por Bertollo *et al.* (1997a) nos Estados do Pará, Rondônia, Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul. Esta forma cariotípica é a mais largamente distribuída na América do Sul, ocorrendo desde o norte do Brasil até o nordeste da Argentina.

Lopes & Fenocchio (1994) confirmaram a existência de outro cariomorfo em exemplares procedentes do Rio Aguapey (Corrientes, Argentina), este cariomorfo é muito semelhante ao encontrado para a população do Vale do Rio Doce (BERTOLLO *et al.*, 1979), apresentando número diplóide igual a 42 cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico; entretanto, esse grupo não revelou a presença de mecanismo de cromossomos sexuais.

Vicari *et al.* (2005), realizaram um estudo citogenético comparativo entre quatro populações de *Hoplias*, das quais três pertencem a Bacia do Rio Ribeira. Todas as populações apresentaram  $2n=42$  cromossomos sem aparente mecanismo de determinação sexual. O rio Juquiá também pertence à bacia do Rio Ribeira, porém os exemplares obtidos neste local apresentaram  $2n=42$  e mecanismo de determinação sexual do tipo XX/XY, estes dados indicam que as duas formas cariotípicas ocorrem em simpatria na Bacia do Rio Ribeira, assim como ocorre em outros locais.

Em uma revisão feita por Bertollo *et al.* (1997a) nos cariomorfos com  $2n=40$  cromossomos, foi observada uma diferença entre as populações estudadas. As populações do Suriname, da Região de Três Marias (MG), dos municípios de Tucuruí (PA), São Luís (MA), Recife (PE) e Natal (RN) apresentaram características peculiares, que permitiram diferenciá-las. Essas populações possuem o primeiro par de cromossomos do cariótipo com tamanho de cerca de  $\frac{1}{4}$  maior que o segundo par, o que não acontece com as outras populações com  $2n=40$  cromossomos.

No Rio Trombetas (PA) foi encontrada mais uma forma cariotípica que parece ser restrita a esta localidade, com  $2n=42$  cromossomos; porém, diferente das demais com 42 cromossomos pelo fato do primeiro par ser relativamente grande e devido à presença de um par acrocêntrico (par 6), que parece ser raro em *Hoplias malabaricus*. Este cariomorfo foi determinado baseado em apenas um indivíduo macho, por isso o cariótipo da fêmea ainda é desconhecido (BERTOLLO *et al.* 2000).

Bertollo *et al.* (2000) classificaram as diferentes formas cariotípicas encontradas em sete cariomorfos distintos que, de maneira resumida, são: (1) **Cariomorfo A** - é

caracterizado por  $2n = 42$  cromossomos sem mecanismo de cromossomos sexuais, possui ampla distribuição, sendo encontrada do norte ao sul do Brasil, no Uruguai e na Argentina (BERTOLLO *et al.* 1979, 2000; BORN & BERTOLLO, 2000); (2) **Cariomorfo B** - apresenta  $2n=42$  cromossomos e mecanismo de determinação sexual simples do tipo XX/XY, este cariomorfo parece ser restrito ao Vale do Rio Doce (MG); (3) **Cariomorfo C** - possui  $2n = 40$  cromossomos sem mecanismo de cromossomos sexuais; (4) **Cariomorfo D** - apresenta  $2n = 40$  cromossomos nas fêmeas e  $2n = 39$  cromossomos nos machos, esta diferença é devida ao mecanismo de determinação sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ; esta forma cariotípica parece ser restrita à bacia do Alto Paraná; (5) **Cariomorfo E** - é bastante semelhante ao cariomorfo A, com  $2n = 42$  sem aparente mecanismo de cromossomos sexuais, a única diferença é o tamanho do primeiro par e a morfologia do par 6 (acrocêntrico), este cariomorfo foi encontrado apenas em Proto Trombetas (PA); (6) **Cariomorfo F** - como o cariomorfo C, apresenta  $2n = 40$  cromossomos sem mecanismo de cromossomos sexuais, porém se diferencia por apresentar o maior par de cromossomos conhecido para *H. malabaricus*, ocorrendo desde o Suriname ao sudeste do Brasil, com preferência na parte oriental do continente; (7) **Cariomorfo G** - apresenta  $2n = 40$  para as fêmeas e  $2n = 41$  para os machos, este heteromorfismo resulta de um sistema de determinação sexual do tipo XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, este cariomorfo está distribuído em poucos lugares da região amazônica.

Observando a macroestrutura cariotípica desses sete cariomorfos, Bertollo *et al.* (2000) os agruparam em dois grandes grupos, baseado na estrutura cariotípica, no sistema múltiplo de cromossomos sexuais e nos cromossomos com uma morfologia rara, pois estes dados parecem ser mais informativos para uma relação filogenética entre as formas cromossômicas que a similaridade entre o número diplóide. O primeiro grupo é composto pelos cariomorfos A, B, C e D, e o segundo composto pelos demais cariomorfos citados. Estudos utilizando técnicas mais específicas como a FISH, demonstraram que a distribuição cromossômica do rDNA 5S é compatível com este agrupamento (FERREIRA *et al.* 2007).

Apesar dos cariomorfos mostrarem características cariotípicas bem distintas, a distribuição da heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) são bastante similares entre as populações e dentro de uma mesma população. A heterocromatina constitutiva geralmente está localizada nas regiões centroméricas/pericentroméricas de todos os cromossomos e na região telomérica de alguns pares (DERGAM & BERTOLLO, 1990; BERTOLLO *et al.*, 1997a; BORN &

BERTOLLO, 2000; VICARI *et al.* 2005). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) estão presentes em vários cromossomos, sendo que o número máximo observado foi de 10 cromossomos. Geralmente ocorrem na posição telomérica, mas podem estar presentes na região intersticial. Em algumas populações há a presença de cromossomos com RONs em ambos os telômeros (RONs biteloméricas) (BERTOLLO, 1996).

Além dos estudos com a citogenética clássica (Giemsa, Ag-RONs e Bandas C), vários outros com citogenética molecular e também a com a genética molecular estão sendo usados para uma melhor caracterização dos cariomorfos e esclarecimento da história evolutiva do grupo *H. malabaricus*. Assim, Dergam *et al.* (1998) utilizando marcadores genômicos RAPD-PCR mostraram a ausência de fluxo gênico entre os cariomorfos A e C, e entre A e D (todos procedentes do rio Paraná e alguns afluentes). Outro estudo, também utilizando marcadores RAPD, mostrou grande divergência genética entre as populações da Bacia do Alto Paraguai e da Bacia Amazônica (LIMA *et al.*, 2008).

O uso de marcadores cromossômicos como os genes ribossomais 18S e 5S também tem mostrado diferenças entre as populações de *H. malabaricus* (VICARI *et al.*, 2005; CIOFFI *et al.*, 2009a). Conforme já citado anteriormente, Martins *et al.* (2006) identificaram uma sequência de DNA satélite centromérica em *H. malabaricus* atualmente conhecida como 5SHindIII-DNA. Essa sequência é bastante similar ao rDNA 5S, porém, enquanto os sítios de rDNA 5S aparecem na região intersticial de até dois cromossomos, os sítios do 5SHindIII-DNA aparecem na região centromérica de até 22 cromossomos. Uma característica interessante é que este DNA satélite parece ser particular de *H. malabaricus* entre os Erythrinidae, pois não foram observados em *H. lacerdae*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Erythrinus erythrinus*, sugerindo que este DNA satélite surgiu, ou foi perdido pelos demais grupos, após a divergência dos principais grupos de Erythrinidae e da divergência das espécies pertencentes ao gênero *Hoplias* (FERREIRA *et al.*, 2007).

Dergam & Bertollo (1990) hipotetizaram que os cariótipos tão diversos por eles detectados, deveriam caracterizar espécies diferentes, uma vez que as diferentes formas cariotípicas podem ser encontradas em simpatria sem a ocorrência de cariótipos híbridos, como é o caso dos cariomorfos C e F (BERTOLLO *et al.*, 1997 a), A e B (BORN & BERTOLLO, 2006) A e C, e A e D (DERGAM *et al.*, 1998).

Frente ao exposto, fica evidente que, de acordo com o conceito de espécie a ser adotado, os dados até aqui obtidos para *Hoplias* “do grupo” *malabaricus* refletem a existência de espécies crípticas com cariótipos específicos (BERTOLLO *et al.*, 1997a; 2000).

## II. Objetivos

Tendo em vista que estudos preliminares realizados em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* em diferentes lagoas e córregos situados na região que se localiza o município de Barra do Garças (MT), sugerem a existência de pelo menos três cariomorfos distintos para a espécie, sendo um deles ainda não descrito para nenhuma população de *H. malabaricus* (VITORINO *et al.*, 2008), o presente trabalho objetivou:

- 1 Realizar um estudo cariotípico nessa última população de *Hoplias malabaricus* que ocorre na região do Médio Araguaia, com a finalidade de se confirmar ou não a existência desse novo cariomorfo.
- 2 Identificar os cromossomos portadores de Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RONs).
- 3 Analisar o padrão de distribuição de heterocromatinas constitutivas nos cariótipos estudados, tanto com os estudos convencionais quanto com técnicas de melhor resolução, tais como o uso de fluorocromos base-específicos, buscando assim uma melhor caracterização da espécie em estudo.
- 4 Aplicar metodologias de análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando-se de sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, 5S*Hind*III-DNA, com a finalidade de melhor caracterizar a população em estudo.

### III. Material e Métodos

#### III.1 Local de Coleta

Os exemplares de *Hoplias malabaricus* foram coletados no município de Pontal do Araguaia, MT, em uma lagoa (Lagoa da Chácara Joyce) localizada nas coordenadas 15°57'30"S / 52°22'07"W. Esse ambiente refere-se à uma pequena lagoa de aproximadamente 250 m<sup>2</sup>, formada pelo represamento de um pequeno córrego afluente da margem direita do Rio Garças.

Após as coletas os animais foram transportados para o Laboratório de Ictiologia do Grupo de Estudos em Peixes do Médio Araguaia (GEPEMA), onde permaneceram por um período de pelo menos 24 horas em aquário bem oxigenado. Em seguida, foram submetidos aos procedimentos para estudos cromossômicos. Após identificação e determinação do sexo, os peixes foram fixados em formalina (formol 10%) por um período não inferior a 72 horas e, em seguida, abundantemente lavados em água corrente e armazenados em álcool 70% em ambiente desprovido de luz na coleção do Laboratório de Ictiologia do GEPEMA/ICBS/UFMT – Pontal do Araguaia, MT.

#### 4.2 - Métodos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos com base na metodologia descrita por Egozcue (1971) e modificada por Bertollo *et al.* (1978). A localização das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada com a técnica de impregnação pela prata de Howell & Black (1980). Para detecção da heterocromatina constitutiva, utilizou-se a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas alterações, e a detecção das regiões ricas em pares de base GC foi obtida com a técnica descrita por Schweizer (1976).

Para a hibridação com as sondas de rDNA 5S, rDNA 18S e da sequência 5SHindIII-DNA isoladas do genoma de *H. malabaricus*, utilizou-se o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001a).

O número diplóide de cromossomos foi determinado para cada um dos espécimes. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX51 com sistema de captura digital de alta resolução. Os cariótipos foram arranjados de acordo com o tamanho dos cromossomos em ordem decrescente, com auxílio do

programa Adobe Photoshop versão 7.0. As medidas cromossômicas também foram obtidas com o programa Adobe Photoshop. Assim, os cromossomos foram classificados por tipos morfológicos distintos, sendo classificados pela relação de braço (RB) em metacêntrico (RB=1,00 a 1,70), submetacêntrico (RB=1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB=3,01 a 7,00), e acrocêntrico (RB a partir de 7,01) (LEVAN, 1964). Além dos cariótipos foi também construído um idiograma com auxílio do programa Adobe Photoshop versão 7.0, com base nas medidas cromossômicas para uma melhor análise dos resultados obtidos.

#### IV. Resultados

Foram analisados 15 exemplares de *Hoplias malabaricus* (6 fêmeas e 9 machos), perfazendo um total de 1084 placas metafásicas em boas condições de estudo. O número diplóide modal constatado foi  $2n=40$  cromossomos (Figura 1). Tanto os cariótipos de fêmeas quanto os de machos são constituídos por 22 cromossomos do tipo metacêntrico (m) 18 submetacêntricos (sm), sem cromossomos sexuais diferenciados morfológicamente (Figura 2 A), sendo o número fundamental (número de braços cromossômicos) igual a 80. As medidas cromossômicas utilizadas para a montagem final dos cariótipos estão apresentadas na Tabela I.

As análises das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) pela coloração com nitrato de prata revelaram a presença de até oito cromossomos portadores de Ag-RONs por placa metafásica. Os sítios estão localizados (i) na região pericentromérica no braço menor de um par sm grande (par 14), porém a visualização desse sítio é bastante difícil, devido ao tamanho reduzido das RONS, (ii) em ambos os telômeros (biteloméricas) de um m de tamanho mediano (par 4) e (iii) na região telomérica do braço longo de um SM pequeno (par 18) (Figura 2 B). Observou-se, também, a presença de até oito nucléolos por núcleo interfásico (Figura 3).

Através do bandamento C foi possível observar blocos de heterocromatina constitutiva na região centromérica de quase todos os cromossomos, nos telômeros do braço longo em alguns pares cromossômicos e marcações biteloméricas em pelo menos um par (par 4) (Figura 2 C). Merece destaque os blocos de heterocromatina na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos grandes (par 14) coincidente com a região das Ag-RONs. Esse bloco heterocromático grande se mostrou bastante polimórfico, com variações inter-individuais; ou seja, ele pode se apresentar em tamanho pequeno em dose dupla, pode aparecer grande em apenas um dos cromossomos do par e também pode aparecer grande em ambos os cromossomos do par. Contudo, a melhor visualização desse polimorfismo só foi possível com a coloração com  $CMA_3$  (Figura 04).

A coloração com  $CMA_3$  revelou que todos os cromossomos portadores de sítios  $Ag^+$  possuem blocos heterocromáticos GC ricos associados, porém, o par com Ag-RONs biteloméricas (par 4) pode aparecer ou não com o sinal  $CMA_3^+$ . Além dessas marcações coincidentes com as Ag-RONs, alguns cromossomos apresentaram

marcações adicionais em seus centrômeros (pares 1, 2, 12, 13 e 17) e telomêros (pares 8, 16 e 19) (Figura 5).

Os resultados obtidos pela técnica de FISH com rDNA 18S permitiram confirmar a localização das RONS nos pares 4, 14 e 18, e um sítio adicional no par 17 que é raramente detectado pela coloração com nitrato de prata (Figura 6 A). Interessante se faz notar que vários sítios  $CMA_3^+$  não manifestam qualquer marcação associada à presença de sítios de DNA ribossômico, como os pares 1, 2, 8, 12, 13, 16 e 19.

A sequência de DNA repetitivo *5SHindIII*-DNA foi mapeada na região centromérica de 12 pares cromossômicos ( $n^{os}$  1, 2, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 19 e 20), totalizando 24 cromossomos portadores dessa sequência (Figura 6 B). A técnica de Double FISH com sondas de rDNA 5S associada com *5SHindIII*-DNA revelou marcações 5S em um único par de cromossomos sm pequenos, em posição pericentromérica (par 19 – Figura 6 C), estando essas sequências em sintenia. Para uma melhor visualização, foi construído um idiograma com a localização dos genes ribossomais rDNA 5S e 18S e da sequência *5SHindIII*-DNA (Figura 7).

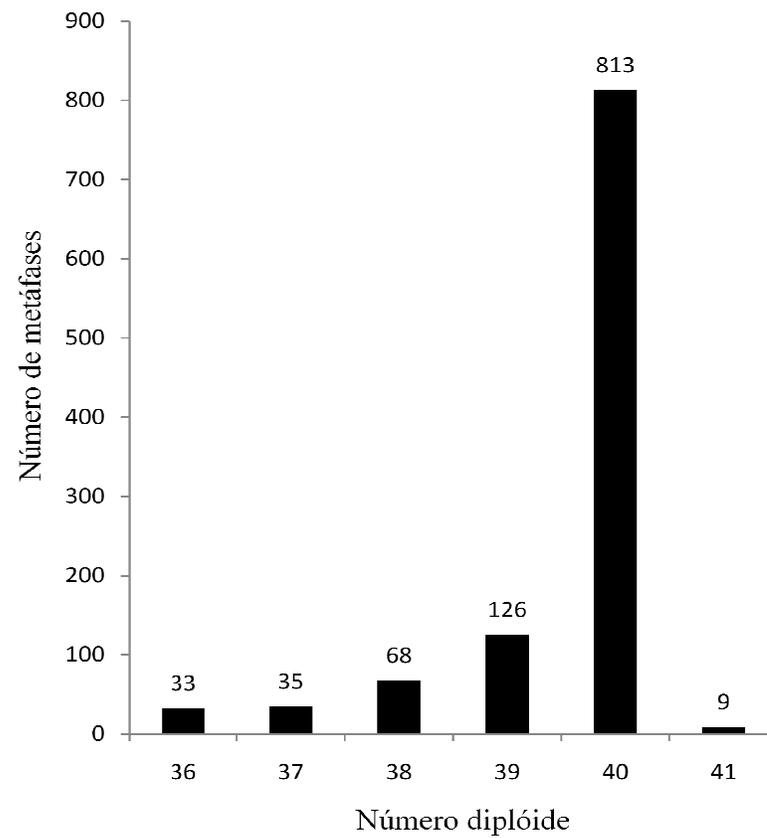


Figura 01. Frequências dos números diplóides da população de *Hoplias malabaricus* em estudo

Tabela I. Medidas cromossômicas para os exemplares de *H. malabaricus*.

Número do	Valores médios				Tipo	
	Par	BM	bm	CT		RB
1		0,80	0,80	1,60	1,00	m
2		0,59	0,56	1,15	1,05	m
3		0,57	0,47	1,04	1,21	m
4		0,53	0,45	0,98	1,18	m
5		0,53	0,41	0,94	1,29	m
6		0,47	0,4	0,87	1,18	m
7		0,42	0,4	0,82	1,05	m
8		0,44	0,36	0,80	1,22	m
9		0,37	0,3	0,67	1,23	m
10		0,32	0,28	0,6	1,14	m
11		0,35	0,28	0,63	1,25	m
12		0,98	0,57	1,55	1,72	sm
13		0,97	0,40	1,37	2,43	sm
14		0,89	0,36	1,25	2,47	sm
15		0,64	0,27	0,91	2,37	sm
16		0,53	0,29	0,82	1,83	sm
17		0,51	0,24	0,75	2,13	sm
18		0,55	0,19	0,74	2,89	sm
19		0,45	0,24	0,69	1,88	sm
20		0,50	0,25	0,75	2,00	sm

BM= braço maior, bm= braço menor, CT=comprimento total, RB= razão de braços, M= metacêntrico e SM= submetacêntrico.

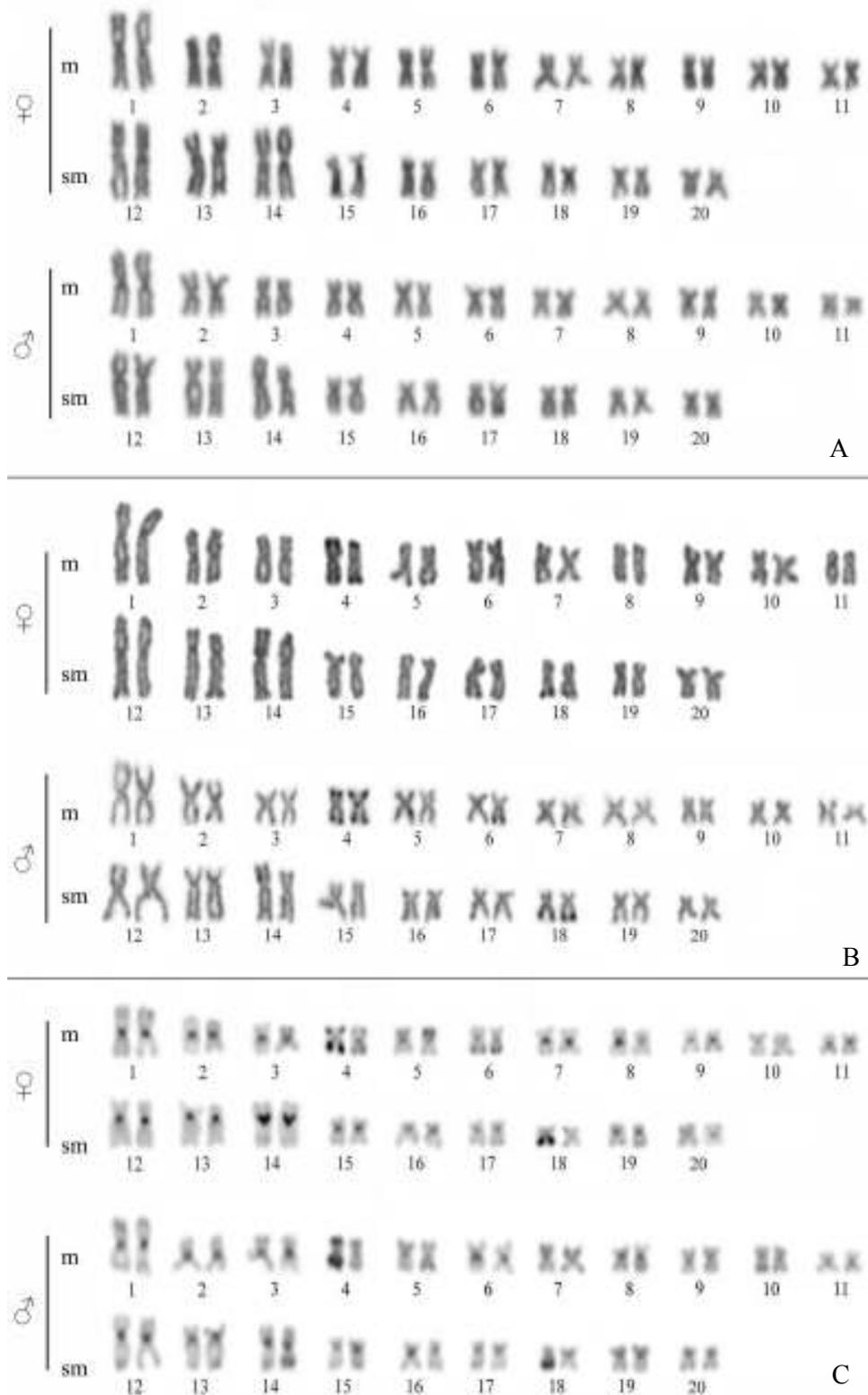


Figura 02. Cariótipo dos exemplares de *Hoplias malabaricus*, coletados na Lagoa da Chácara Joyce, no município de Pontal do Araguaia (MT). (A) Coloração com Giemsa. (B). Coloração com nitrato de prata. (C) Padrão de bandamento C

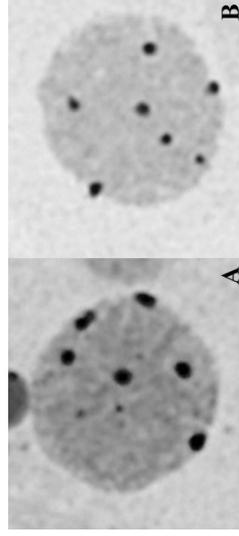


Figura 3. Células coradas com nitrato de prata, mostrando a presença de (A) oito nucléolos e (B) sete nucléolos.

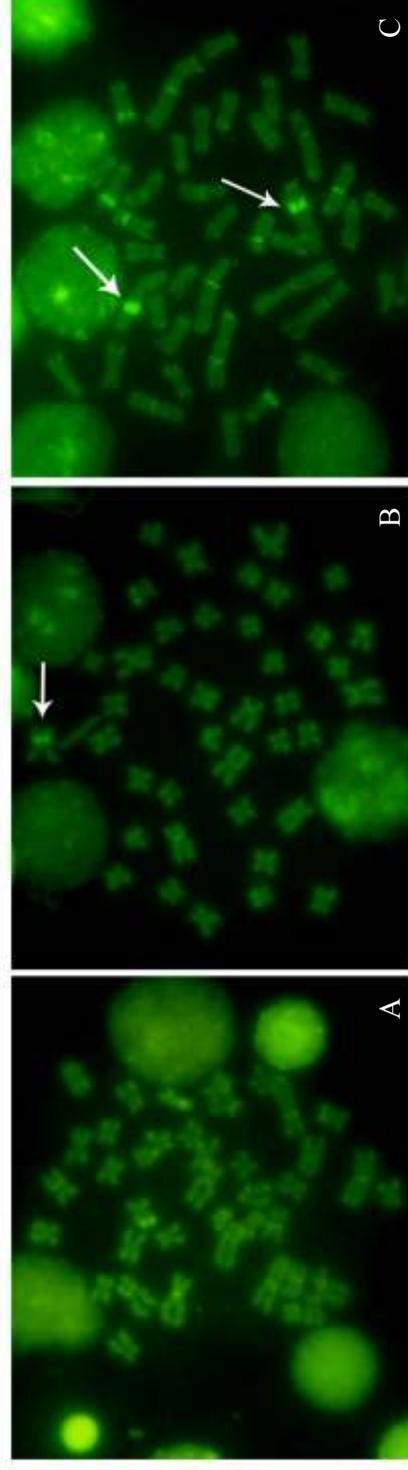


Figura 04. Coloração com Cromomicina A<sub>3</sub>, mostrando o polimorfismo existente no par de cromossomos. Em (A) há a presença apenas de blocos heterocromático GC ricos pequenos, em (B) há apenas um cromossomo portador do bloco heterocromático GC rico grande e em (C) pode-se observar a presença do par com o bloco.



Figura 05. Cariótipo de *H. malabaricus* obtidos após a coloração com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>. Os blocos mais brilhantes se referem a regiões de heterocromatina GC-ricas.

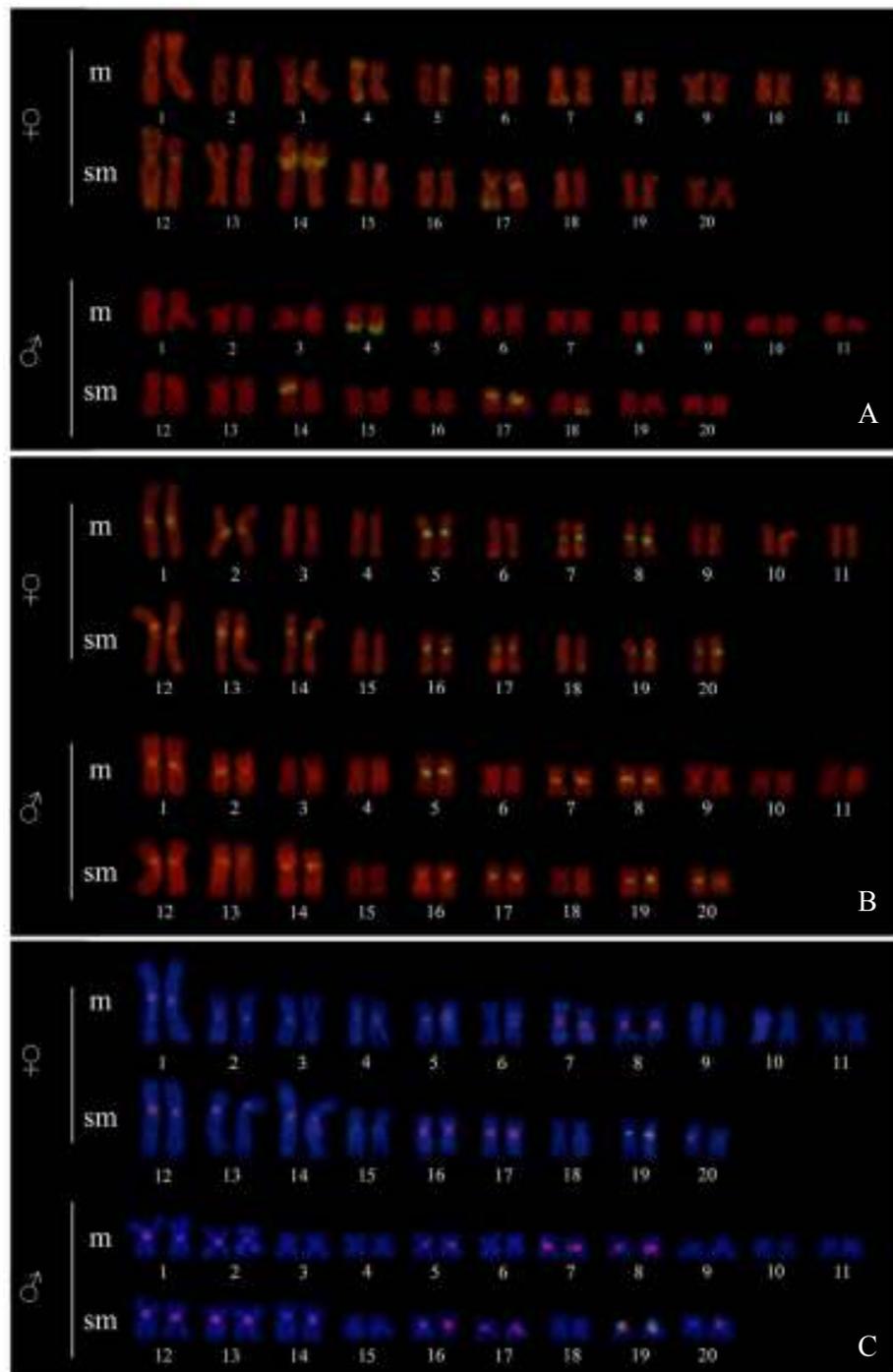


Figura 06. Cariótipos de fêmeas e machos após a aplicação da técnica de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) com as sondas de rDNA 18S, 5SHindIII-DNA e *Double-FISH* com as sondas 5SHindIII-DNA + rDNA 5S, em *Hoplias malabaricus*.

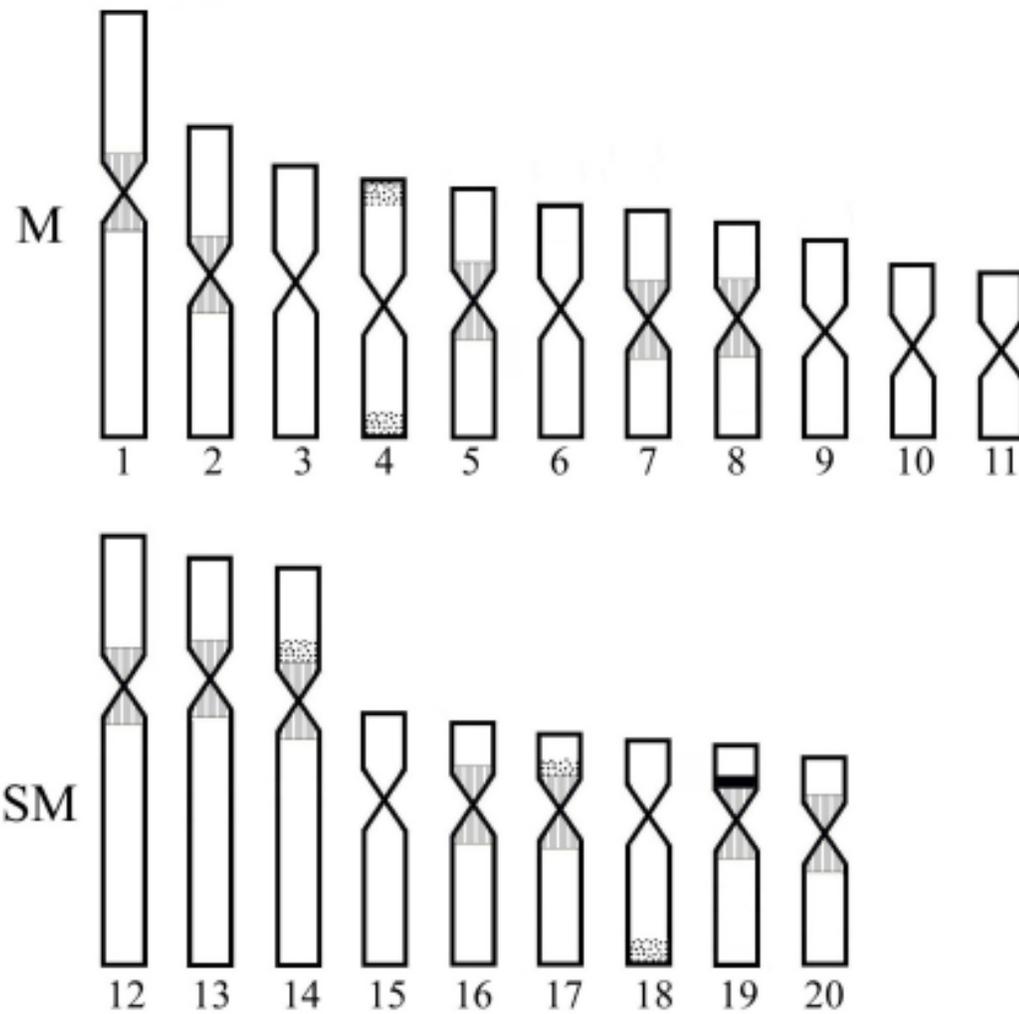


Figura 07. Idiograma representativo do lote haplóide para a população de *Hoplias malabaricus*. Na figura são mostrados:

▤ rDNA 18S, ▨ Sequência satélite 5SHindIII e ■ rDNA 5S

## V. Discussão

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho, mais uma vez confirmam uma variabilidade cariotípica bastante interessante associada às espécies do gênero *Hoplias*, mais especificamente, no presente caso, no complexo de espécies atualmente tratado como *Hoplias malabaricus*.

Como já abordado, os vários estudos citogenéticos realizados em exemplares desse complexo, procedentes das mais diferentes bacias hidrográficas da América do Sul, têm revelado ocorrência de diferentes citótipos (atualmente organizados como cariomorfos), descritos para a espécie, os quais se diferenciam pela presença de números diplóides distintos e diferentes tipos de mecanismos cromossômicos de determinação sexual. No total foram sugeridos por Bertollo *et al.* (2000) sete cariomorfos facilmente reconhecidos apenas com base em estudos citogenéticos clássicos (Cariótipo, Bandas C e localização das Ag-RONs).

Com o advento de novas metodologias mais resolutivas, que têm permitido um nível de análise bastante refinado, um novo quadro vem se desenhando. Alguns dos cariomorfos já descritos, como é o caso do cariomorfo A, quando estudado em diferentes bacias hidrográficas revelaram que apesar da macroestrutura parecer conservada, o uso de marcadores moleculares mostrou que existem diferenças bastante particulares no que se refere ao posicionamento, por exemplo, dos sítios de rDNA 5S e no número de sítios de 5S *Hind*III-DNA (CIOFFI *et al.*, 2009b).

As primeiras análises realizadas nos exemplares aqui estudados sugeriram uma possível ocorrência de um novo cariomorfo para essa espécie. Entretanto, ao se analisar em conjunto todos os dados disponíveis na literatura para o grupo, percebeu-se que uma análise cromossômica apenas baseada em estudos citogenéticos básicos não permitiria a confirmação ou não dessa informação. Diante disso, buscou-se então ampliar as amostragens e, fundamentalmente, aplicar novas técnicas citogenéticas.

No conjunto, os resultados obtidos confirmaram o número diplóide de 40 cromossomos para fêmeas e machos (24M+16SM). Entretanto, o mecanismo de cromossomos sexuais não pôde ser plenamente confirmado após a análise conjunta dos cariótipos com as diferentes técnicas citogenéticas propostas. Apesar de algumas características sugerirem uma similaridade com o cariomorfo C (*sensu* BERTOLLO, *et al.* 2000), pequenas diferenças puderam ser detectadas, ou seja, o cariomorfo descrito como C é, na verdade, constituído por 14 cromossomos do tipo m e 26 do tipo sm.

O mecanismo de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY sugerido por Neves *et al.* (2003) e Vitorino *et al.* (2008) possivelmente se deve ao fato dos estudos iniciais terem se baseado num número baixo de exemplares de um dos sexos ou mesmo por uma interpretação com base em análises com Giemsa, Ag-RONs e Bandas C. Além disso, de maneira geral, os cariótipos são ricos em blocos heterocromáticos pericentroméricos, sendo o par 14 portador de grandes blocos que se prolongam pelo seu braço curto, além de vários blocos teloméricos. Vários desses blocos heterocromáticos mostram-se variáveis, principalmente nos vários machos analisados, o que possivelmente induziu a uma interpretação errônea de seu significado. Com refinamento das técnicas, pôde-se sanar parcialmente essa dúvida, com a exclusão da possível ocorrência de um mecanismo cromossômico de determinação sexual bem diferenciado.

É possível observar que as variações encontradas no presente trabalho, não são mantidas entre diferentes indivíduos machos, o que pode indicar condensações diferenciais entre os cromossomos, devido à presença dos blocos de heterocromatina constitutiva, observados nos diferentes indivíduos analisados. O uso das técnicas de coloração com Cromomicina A<sub>3</sub> e a hibridação de sequências repetitivas revelou um quadro bastante interessante e novo para a população estudada. Primeiramente, destaca-se que a coloração com nitrato de prata revela a expressão dos genes ribossomais, evidenciando apenas os cromossomos portadores de RONS ativas na interfase precedente à mitose (HOWELL & BLACK, 1980). A quantidade, o pequeno tamanho e a ausência de polimorfismo no tamanho das Ag-RONs observados nessa população de *Hoplias malabaricus* estão de acordo com os dados descritos na literatura para esta espécie (BERTOLLO, 1996). Eventualmente, nem todos os cromossomos homólogos se apresentam como portadores de Ag-RONs ativas, ocorrendo diferenças em número intra- e inter-individualmente. De acordo com Born & Bertollo (2001) essas variações estão ligadas à atividade gênica.

A ocorrência de RONS múltiplas não era vista como uma ocorrência comum para a maioria dos teleósteos e vertebrados (AMEMIYA & GOLD, 1986). Entretanto, análises mais cuidadosas realizadas em diferentes grupos de Characiformes revelaram que grupos anteriormente citados como portadores de Ag-RONs simples, na verdade possuem mais de um par de cromossomos envolvidos com a organização nucleolar (VENERE & GALETTI, 1989; VENERE *et al.*, 2008).

As RONS biteloméricas, também, não são muito comuns entre os peixes, entretanto em *Hoplias malabaricus*, esta característica parece estar fixada, pois é encontrada, além da população ora estudada, em várias outras pertencentes aos diferentes cariomorfos descritos para o complexo (BERTOLLO, 1996). Outra característica marcante na população estudada se refere à ocorrência de um par com Ag-RONS em posição pericentromérica no braço curto de cromossomos submetacêntricos de tamanho grande, que foi observada em uma frequência bastante baixa. Esse mesmo par é aquele portador de blocos heterocromáticos de tamanhos variáveis (par nº 14).

As RONS são muito utilizadas como marcadores cromossômicos espécie-específicos, pois geralmente possuem uma localização muito constante nas espécies de peixes (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1996). Geralmente, estão associadas a regiões de heterocromatina, sendo chamadas de banda C positivas (GALETTI *et al.*, 1984). No presente trabalho as RONS se mostraram bandas C positivas, até mesmo o par com RONS pericentroméricas. Aparentemente, as variações observadas na população estudada com relação à distribuição das heterocromatinas estão associadas também às variações detectadas nas Ag-RONS.

Além dos blocos de heterocromatina coincidentes com as Ag-RONS, há blocos heterocromáticos em quase todos os centrômeros. Essa característica parece ser compartilhada por todas as populações de *H. malabaricus* estudadas até o presente (DERGAM & BERTOLLO, 1990; BERTOLLO *et al.*, 1997a; BORN & BERTOLLO, 2000; VICARI *et al.* 2005). Segundo Imai (1991), as espécies que possuem a heterocromatina principalmente na região pericentromérica são aquelas nas quais a diversificação cariotípica foi acompanhada por um número maior de fusões e inversões pericêntricas, pois esses rearranjos facilitariam a perda da heterocromatina dos telômeros e da região intersticial dos cromossomos, restando apenas a heterocromatina da região centromérica.

Apesar de ser uma técnica útil, o bandamento C não fornece informações sobre a composição da heterocromatina, sendo inespecífica até mesmo para a presença de DNA satélites (PIECZARKA & MATTEVI, 1998). Desta forma, para a análise da composição da heterocromatina, com relação ao tipo de base, geralmente, faz-se uso dos fluorocromos base-específicos. Dentre esses, os mais utilizados na citogenética de peixes são DAPI e Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), que coram preferencialmente regiões ricas em pares de base A-T (DAPI) e G-C (CMA<sub>3</sub>). No presente estudo, foi utilizado apenas CMA<sub>3</sub>, pois os fluorocromos A-T específicos, geralmente, produzem poucas bandas

evidentes em peixes. Apenas bandas negativas que são coincidentes com as bandas produzidas por CMA<sub>3</sub> são, algumas vezes, observadas (SCZEPANSKI, 2008). As bandas produzidas pela CMA<sub>3</sub> nesta população de *H. malabaricus* são coincidentes com blocos heterocromáticos, principalmente aqueles associados às Ag-RONs. Assim, a maioria das RONs observadas são coincidentes com as bandas C e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (possivelmente ricas em pares de base GC), como acontece em outras populações de *H. malabaricus* (VICARI *et al.* 2005), e em vários outros grupos de peixes, como alguns Characinae e Cynopotaminae (VENERE *et al.* 1997), os gêneros *Leporinus* (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO & GALETTI, 2000), *Astyanax* (SOUZA *et al.*, 2007) e *Salminus* (SOUZA *et al.*, 2008).

A região heterocromática observada no par cromossômico n°14, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, apresenta alto grau de variação em seu tamanho. Uma situação semelhante foi observada por Vicari *et al.* (2005) para uma população de *H. malabaricus* portadora do Cariomorfo A procedente do Rio Iguaçu; porém, essa variação ocorre em um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio. Situação similar também foi encontrada no cariomorfo B; porém, neste caso ele está associado a um mecanismo de cromossomos sexuais (BORN & BERTOLLO, 2000).

Essa variabilidade no tamanho das bandas citadas aparentemente ocorre independentemente do sexo na população ora estudada. Porém a variação no tamanho entre os cromossomos homólogos envolvidos ocorre preferencialmente nos machos analisados. Essa variação observada parece ser bastante incipiente e por esse motivo preferiu-se não utilizá-la ainda para se propor a ocorrência de cromossomos sexuais. Prefere-se então, de maneira mais parcimoniosa, sugerir que essa diferença, provavelmente, se refere a um processo de início de diferenciação de cromossomos sexuais. De qualquer forma, ainda que se possa sugerir um estreito parentesco entre o grupo ora estudado com espécies portadoras do Cariomorfo C, fica evidente que existem diferenças cromossômicas suficientes para caracterizá-lo como uma unidade evolutiva independente dentro do complexo *Hoplias malabaricus*.

Situação semelhante também foi detectada para uma população com cariótipo semelhante ao descrito como Cariomorfo A (BERTOLLO *et al.*, 1979). De acordo com Cioffi *et al.* (2009b), essa população possui algumas características cromossômicas bem fixadas que fogem ao padrão originalmente descrito como Cariomorfo A. Vicari *et al.* (2005), também descrevem situação semelhante, ou seja, segundo esses autores, os cromossomos com bandas polimórficas encontrados na população do Rio Iguaçu

(Cariomorfo A) parecem ser homólogos aos cromossomos X do Cariomorfo B. De acordo com esses últimos autores, isso sugere que o cariomorfo B possa ter se originado de um cariótipo semelhante ao encontrado nessa população do Rio Iguaçu.

Vicari *et al.* (2003) confirmaram a presença desse polimorfismo de bandas simples e duplicadas pela hibridação *in situ* com genes ribossômicos 18S. No presente trabalho pôde-se observar que os sítios 18S são coincidentes com as Ag-RONs e com as marcações obtidas pela Cromomicina A<sub>3</sub> relacionadas às Ag-RONs. Entretanto pode se observar a presença de sítios 18S no par 17, esse sítio raramente aparece com a coloração com nitrato de prata, isso pode ser explicado pela ausência de atividade gênica desse sítio, uma vez que a prata tem afinidade apenas pelos sítios que estiveram ativos na última divisão celular precedente à fixação da célula.

A hibridação *in situ* do gene ribossômico 5S, evidenciou apenas 2 sítios localizados na porção intersticial do cromossomo nº19, semelhante aos cariomorfos B (BORN & BERTOLLO, 2000), D (CIOFFI *et al.*, 2009) e F (FERREIRA *et al.*, 2007), enquanto os Cariomorfos A e C apresentam 4 sítios (CIOFFI *et al.*, 2009). A presença de apenas um par portador do rDNA 5S é a situação mais comumente observada entre os peixes e, segundo Martins & Galetti Jr (1999), essa parece ser a condição mais primitiva entre os diversos grupos de animais.

Apesar de possuírem o sítio do rDNA 5S em apenas um par de cromossomos, os cariomorfos B, D, F e o do presente estudo se diferenciam pelo cromossomo portador desse sítio. No Cariomorfo B eles foram mapeados em um metacêntrico pequeno, na região intersticial do braço longo, enquanto que nos cariomorfos D e F eles foram mapeados na posição intersticial do braço curto de diferentes cromossomos: em D eles estão localizados no par cromossômico nº 5 e em F no par nº 9 (FERREIRA *et al.*, 2007). No presente estudo esse sítio ribossomal foi mapeado em um cromossomo sm pequeno (par 19).

Segundo Martins & Wasko (2004), a localização intersticial tem sido a mais encontrada para os diversos grupos de peixes. Diante disso, esses autores sugeriram que esta organização deve representar alguma vantagem para o genoma dos vertebrados ao observarem que os *loci* do rDNA 5S são bastante conservados entre as diversas espécies de peixes por eles analisados, indicando que estes clusters estão protegidos de possíveis mudanças significativas na estrutura cariotípica. De acordo como os trabalhos de Ferreira *et al.* (2007) e Cioffi *et al.* (2009a) *H. malabaricus* não apresenta uma localização cromossômica conservada para o gene rDNA 5S, ao contrário do que

acontece para os vários grupos de peixes. Essa característica também foi confirmada pelos dados obtidos no presente estudo.

Os sítios de rDNA 5S não estão associados aos sítios de RONS. A localização dos sítios de rDNA 5S e 45S em cromossomos distintos tem sido encontrada na maioria dos vertebrados. Aparentemente essa situação impede que aconteçam rearranjos da sequência 5S dentro do sítio portador do gene para rDNA 45S (MARTINS & GALETTI Jr., 1999).

No presente trabalho, o rDNA 5S e a sequência repetitiva 5SHindIII-DNA aparecem em sintenia, ou seja, estão localizados em um mesmo cromossomo. O 5SHindIII-DNA é uma família de DNA organizada em tandem, presente na região centromérica e provavelmente originado do rDNA 5S. Essa sequência apresenta várias cópias no genoma de *H. malabaricus*, sugerindo uma alta taxa de evolução no genoma (MARTINS *et al.*, 2006). Na população estudada, os sítios de 5SHindIII-DNA foram localizados em 24 cromossomos, em posição pericentromérica. Para os cariomorfos A e B foram localizados 18 sítios de 5SHindIII-DNA, enquanto para os cariomorfos C e D foram localizados 22 sítios (CIOFFI *et al.*, 2009 a) e 20 sítios no cariomorfo F (FERREIRA *et al.*, 2007), todos os sítios estão localizados na região centromérica. Segundo FERREIRA *et al.* (2007) a sequência repetitiva 5SHindIII-DNA tem acompanhado as mudanças cromossômicas que levaram aos diferentes cariótipos encontrados para esta espécie.

Diante do exposto, fica evidente que há pequenas diferenças entre os cromossomos de alguns pares (principalmente em relação aos menores cromossomos) as quais, entretanto, parecem não ser consistentes uma vez que alguns cariótipos de fêmeas e/ou de machos parecem não apresentá-las. Em outros momentos, as diferenças são aparentemente devidas a situações polimórficas ainda mal quantificadas. Mesmo assim, as diferenças observadas ocorrem principalmente entre os machos; porém, mesmo entre diferentes machos elas não são mantidas, sugerindo prováveis condensações diferenciais entre os cromossomos.

Ao analisarem uma população de *Hoplias malabaricus* do Cariomorfo C da região de Cuiabá, Cioffi & Bertollo (2010) observaram uma ocorrência semelhante àquela observada no par 14 da população aqui estudada, porém, em relação a outro par de cromossomos. Ou seja, existe o par heteromórfico em relação aos sítios CMA<sub>3</sub> positivos e 18S (mas não em relação ao tamanho), mas esse não é definitivamente um par de cromossomos de tamanho grande, como é o caso do cromossomo 14 estudado no

presente trabalho. Trata-se de um cromossomo nitidamente menor. Esses dados foram interpretados como sendo um caso XX/XY em fase inicial de diferenciação.

Aparentemente o caso analisado no presente trabalho revela uma situação parecida com o caso relatado acima. Entretanto é curioso que, se de fato ocorresse um sistema XX/XY nessa população, os cromossomos envolvidos seriam, pelo menos aparentemente, distintos daqueles estudados por Cioffi & Bertollo (2010).

Concluindo, com os dados obtidos no presente trabalho é possível afirmar com segurança que a população de *Hoplias* discutida no presente trabalho representa mais uma unidade evolutiva independente dentro do complexo de espécies “*malabaricus*”. As diferenças apresentadas e discutidas acima claramente demonstram que esse grupo representa um importante material para análise e interpretação de mecanismos de especiação que permanentemente estão atuando nas diferentes populações de organismos e representa um interessante modelo a ser extensivamente explorado.

## **VI. Referências Bibliográficas:**

Todas as referências desse capítulo se encontram no item Bibliografia Geral na página 51.

## CAPITULO II

Citogeografia: *Hoplias malabaricus*, um modelo a ser explorado.

## I. Introdução

O processo de fragmentação ambiental pode existir naturalmente. Entretanto, nas últimas décadas tem sido bastante intensificado pela ação antrópica que traz, como consequência, um número elevado de problemas para as diferentes comunidades (CERQUEIRA *et al.*, 2003). O impacto da fragmentação sobre o ambiente depende da distância entre os fragmentos ou grau de isolamento, o tamanho e a forma do fragmento, o tipo de matriz circundante e o efeito de borda (BIERREGAARD-Jr. *et al.*, 1992). Em relação às águas doces, os lagos e os reservatórios são considerados os fragmentos de um rio, e podem ter origem natural ou artificial (ESPÍNDOLA *et al.*, 2003)

Num primeiro momento, o isolamento físico traz como consequência o isolamento reprodutivo. Com isso, o fluxo gênico é interrompido e, após um longo intervalo de tempo, as populações desses fragmentos tendem a se diferenciar devido a pequenas mudanças cumulativas, que se devem a adaptação da espécie ao novo ambiente e ao fato da variabilidade genética presente estar sujeita às forças do acaso (GUERRA, 1988).

A fragmentação do habitat pode levar muitas espécies à extinção. Além disso, provocar o declínio das populações, uma vez que as tornam vulneráveis à depressão endogâmica, aumento da frequência de alelos deletérios e outros problemas associados ao pequeno tamanho populacional (PINTO *et al.*, 2004). Por outro lado, algumas espécies conseguem superar esses problemas da depressão endogâmica e se mantêm indefinidamente nesses pequenos fragmentos, como parece ser o caso das espécies do gênero *Hoplias* (traíras). Porém, os mecanismos que garantem a existência de tantas populações isoladas de traíras ainda não são conhecidos. Nesse mesmo sentido vale ressaltar que, em algumas situações encontradas para os diferentes cariomorfos já descritos para *H. malabaricus* (vide BERTOLLO *et al.*, 2000 para uma revisão), existe ainda a necessidade de se confirmar se alguns deles não podem ser, na verdade, reflexos da existência de metapopulações com suas subunidades amplamente distribuídas ao longo das grandes bacias hidrográficas onde foram descritos.

O estudo da variabilidade genética de populações é considerado uma das principais áreas da conservação biológica, pois, segundo o teorema fundamental da seleção natural, a taxa de mudanças evolutivas dentre as populações é diretamente determinada pelo conteúdo de diversidade presente no material genético (ARTONI & MATTIELO, 2003).

Nesse contexto, análises genéticas e citogenéticas têm sido úteis para a ecologia e biologia da conservação, pois, além de auxiliar no mapeamento e distribuição geográfica de algumas espécies, permite a identificação de espécies de difícil caracterização morfológica ou mesmo a identificação de híbridos naturais como, por exemplo, o caso descrito para *Cichla monoculus* e *C. temensis* (BRINN *et al.*, 2004), uma vez que o cariótipo constitui uma característica imune às variações ambientais, comportamentais ou fisiológicas (GUERRA, 1988).

Assim, a análise genética de espécies crípticas, ou seja, aquelas que são morfológicamente idênticas, mas constituem unidades evolutivas independentes, é fundamental para a correta identificação e para o estabelecimento de políticas de proteção adequadas. Além disso, é a composição genética de uma espécie que fornece o seu potencial adaptativo e evolutivo, por isso é importante ter o conhecimento se a estruturação genética encontrada é uma característica natural ou é resultado de um isolamento físico causado pelo homem (GALETTI, *et al.*, 2008).

Em especial, a espécie *Hoplias malabaricus* representa um excelente exemplo para mostrar a importância da citogenética para a biologia da conservação, e as consequências do isolamento geográfico e reprodutivo. Esta espécie é caracterizada por grande diversidade cromossômica, tendo sido descritos sete formas cariotípicas distintas (cariomorfos A, B, C, D, E, F e G) nas diferentes bacias hidrográficas onde foi estudada (BERTOLLO, *et al.*, 2000). Diante dessa grande diversidade, Dergam & Bertollo (1990) propõem que o grupo deve ser tratado como um “complexo de espécies”.

As traíras são bastante conhecidas por possuírem hábito sedentário, ocuparem habitats preferenciais de cabeceiras de rios e também, por viverem em lagoas e lagos que propiciam isolamentos geográficos, sejam eles naturais ou antrópicos. Graças a essas características, as populações dessa espécie possuem baixo ou mesmo nenhum fluxo gênico entre subpopulações de uma mesma bacia hidrográfica, favorecendo a fixação de variações cariotípicas significativas entre elas (SANTOS, *et al.* 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de analisar comparativamente as informações citogenéticas obtidas para uma população da espécie *Hoplias malabaricus*, isolada geograficamente, com os demais dados disponíveis na literatura para as espécies do complexo “*H. malabaricus*” já estudadas. Da mesma forma, pretende-se verificar se as variações cromossômicas encontradas representam apenas casos de polimorfismos ou se referem à existência de espécies crípticas ainda não descritas como unidades evolutivas independentes.

## II. Material e Métodos

Foram estudados 16 espécimes de *Hoplias malabaricus*, (7♀ e 9♂), procedentes de uma lagoa no município de Pontal do Araguaia (Estado de Mato Grosso, Brasil), localizada a 15°57'30"S / 52°22'07"W. Essa lagoa possui aproximadamente 250 m<sup>2</sup>, e representa um fragmento de origem antrópica, criada pelo represamento de um pequeno córrego afluente da margem direita do Rio Garças (Bacia Tocantins-Araguaia), a mais de vinte anos (não foi possível se precisar a data de sua construção). Com o represamento houve mudança do ambiente lótico para lântico.

A matriz do entorno é muito pobre em vegetação e é caracterizada por pastagens e pequenos fragmentos de mata de galeria. Por esse motivo, o nível da água sofre grandes flutuações relacionadas ao regime hidrológico (períodos de cheia e seca). Durante os períodos de seca, a água se torna bastante reduzida, o que faz supor que nesse período ocorre uma diminuição na oferta e conseqüente aumento na competição pelo alimento.

Para a coleta, foram utilizadas varas de pesca com linhas e anzóis iscadas com peixes ou pequenos pedaços de carne. Os exemplares coletados estão depositados na Coleção Ictiológica do *Campus* Universitário do Araguaia/GEPEMA. As preparações cromossômicas foram obtidas pela técnica de suspensão celular descrita por Bertollo *et al.* (1978). A localização das regiões organizadoras de nucléolos foi realizada com a técnica de impregnação pela prata (HOWELL & BLACK, 1980). Para detecção da heterocromatina constitutiva, utilizou-se a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas alterações, e a detecção das regiões ricas em pares de base GC foi obtida com a técnica descrita por Schweizer (1976).

Para a hibridação das sondas de rDNA 5S, rDNA 18S e da sequência 5S*Hind*III-DNA isoladas do genoma de *H. malabaricus*, utilizou-se o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001).

O número diplóide foi determinado para cada um dos exemplares e os cariótipos foram arranjados de acordo com o tamanho dos cromossomos em ordem decrescente e, também por tipos morfológicos distintos, sendo classificados pela relação de braço (RB) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) seguindo os critérios de Levan *et al.* (1964).

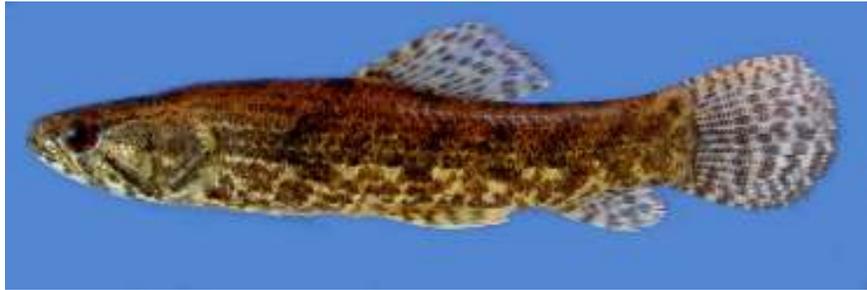


Figura 1 - Exemplar da espécie *Hoplias malabaricus*

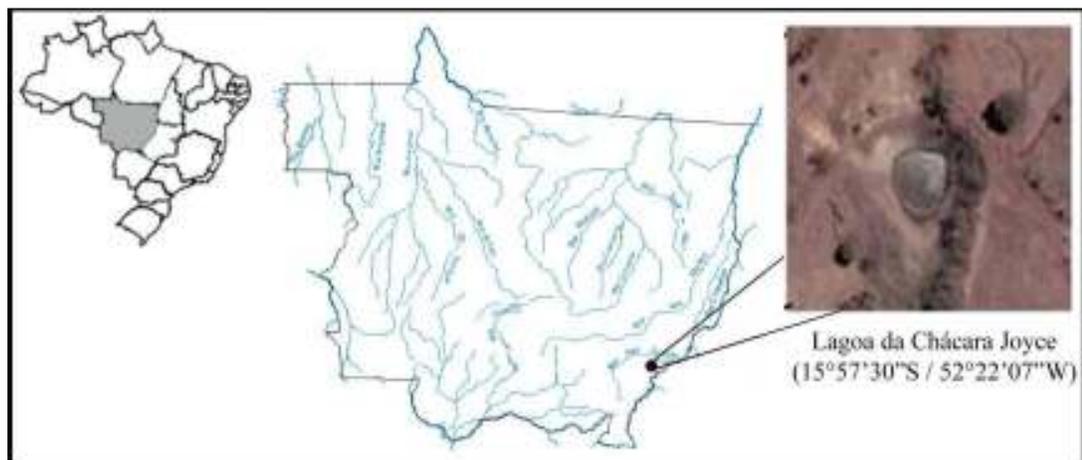


Figura 2. Local de coleta. No destaque observa-se a lagoa onde os peixes foram capturados.

### III. Resultados

Todos os espécimes analisados apresentaram  $2n=40$  cromossomos, tanto para os machos, quanto para as fêmeas, sem nenhum mecanismo de cromossomos sexuais evidente (Figura 3). No total, até sete cromossomos apresentaram Ag-RONs positivas. Esses sítios estão localizados (i) em ambos os telômeros de um par de cromossomos **m** de tamanho médio (AgRONs biteloméricas), (ii) na região pericentromérica do braço curto de um cromossomo **sm** grande; (iii) na região pericentromérica de um cromossomo **sm** pequeno; (iv) na porção telomérica do braço longo de um par de **sm** médio e (v) na porção telomérica de um cromossomo **sm** pequeno (Figura 4A).

O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva na região centromérica de quase todos os cromossomos, nos telômeros do braço longo em vários pares cromossômicos e marcações biteloméricas em pelo menos um par (Figura 4B). Alguns blocos heterocromáticos, visualizados pela coloração com  $CMA_3$ , apresentaram variações intra-individuais de tamanho, merecendo destaque o par nº14 (identificado após uma série de análises com base em colorações sequenciais de diferentes metáfases), no qual as bandas heterocromáticas podem se apresentar em tamanho pequeno em dose dupla, em tamanho grande em apenas um dos cromossomos do par e também grande em dose dupla (Figura 4 e Figura 5 A,B).

Várias das regiões de heterocromatina, presumivelmente ricas em pares de base GC, foram coincidentes com os sítios  $Ag^+$ . Além dessas, outros sítios  $CMA_3^+$ , não associados às Ag-RONs, também estão presentes nos telômeros do braço longo de vários outros pares (Figura 5 A,B). A hibridação *in situ* com rDNA 18S confirmou a presença de oito cromossomos portadores de sítios de DNAr (Figura 5C), revelando assim que muitos sítios  $CMA_3^+$  não manifestam qualquer marcação associada à presença de regiões organizadoras de nucléolos.

O DNA satélite 5SHindIII foi localizado na região centromérica de pelo menos 24 cromossomos (Figura 5D). Os sítios de rDNA 5S foram mapeados na região intersticial do braço menor de apenas um par cromossômico **sm**, estando em sintonia com a sequência 5SHindIII-DNA (Figura 5D).

Na tabela I estão resumidos os dados citogenéticos disponíveis para o complexo *H. malabaricus*. Da mesma forma, preocupou-se em plotar em um mapa (Figura 6), os locais de procedência dos diferentes cariomorfos, com a finalidade de se ter uma base para interpretar possíveis mecanismos associados à distribuição geográfica desses organismos.

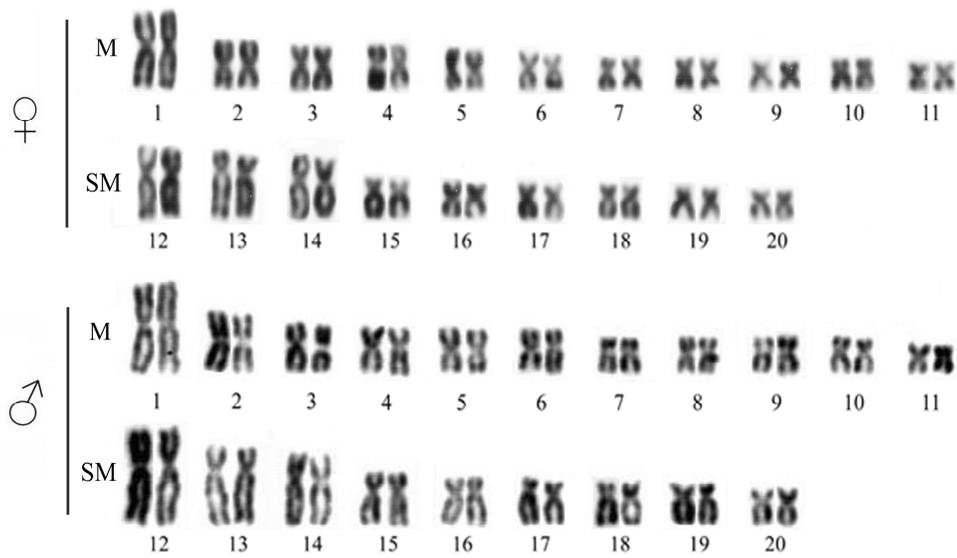


Figura 3. Cariótipos obtidos para fêmeas e machos de *Hoplias malabaricus* coletados na Lagoa da Chácara Joyce, município de Pontal do Araguaia, MT.

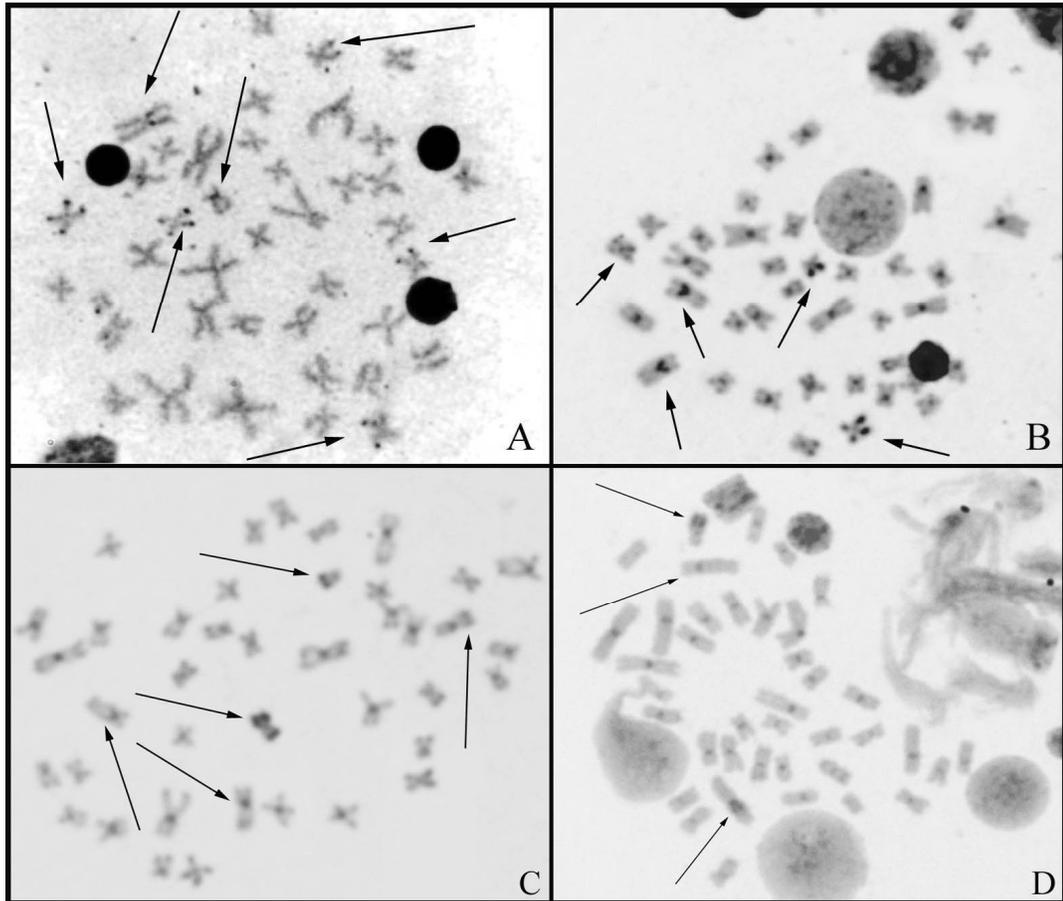


Figura 4. Metáfases de *Hoplias malabaricus*, A) mostrando os cromossomos portadores de Ag-RONs teloméricas, biteloméricas e pericentroméricas (setas); B, C e D) bandas C - as setas indicam alguns blocos de heterocromatina que apresentam variações intra-individuais.

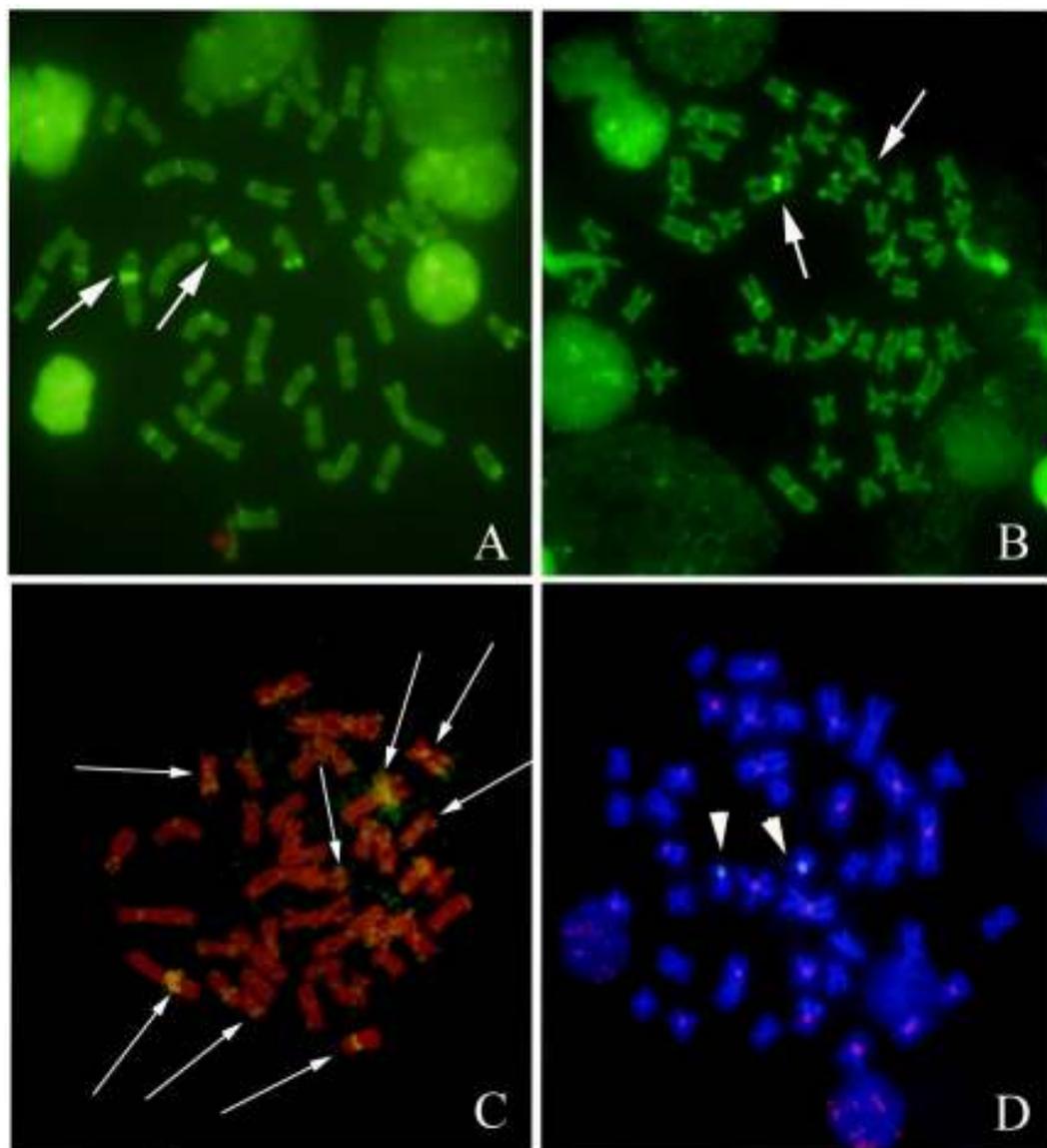


Figura 5. Metáfases de *Hoplias malabaricus*, (A e B) após coloração com cromomicina mostrando os blocos heterocromáticos  $CMA_3^+$ . As setas indicam os blocos descritos para o par nº14. (C) metáfase após FISH com sondas de rDNA 18S (setas indicam os cromossomos portadores de RONs). (D) Double FISH. As cabeças de setas mostram os cromossomos portadores de sítios de rDNA 5S. As regiões pericentromérica em vermelho correspondem aos sítios 5SHyndIII.

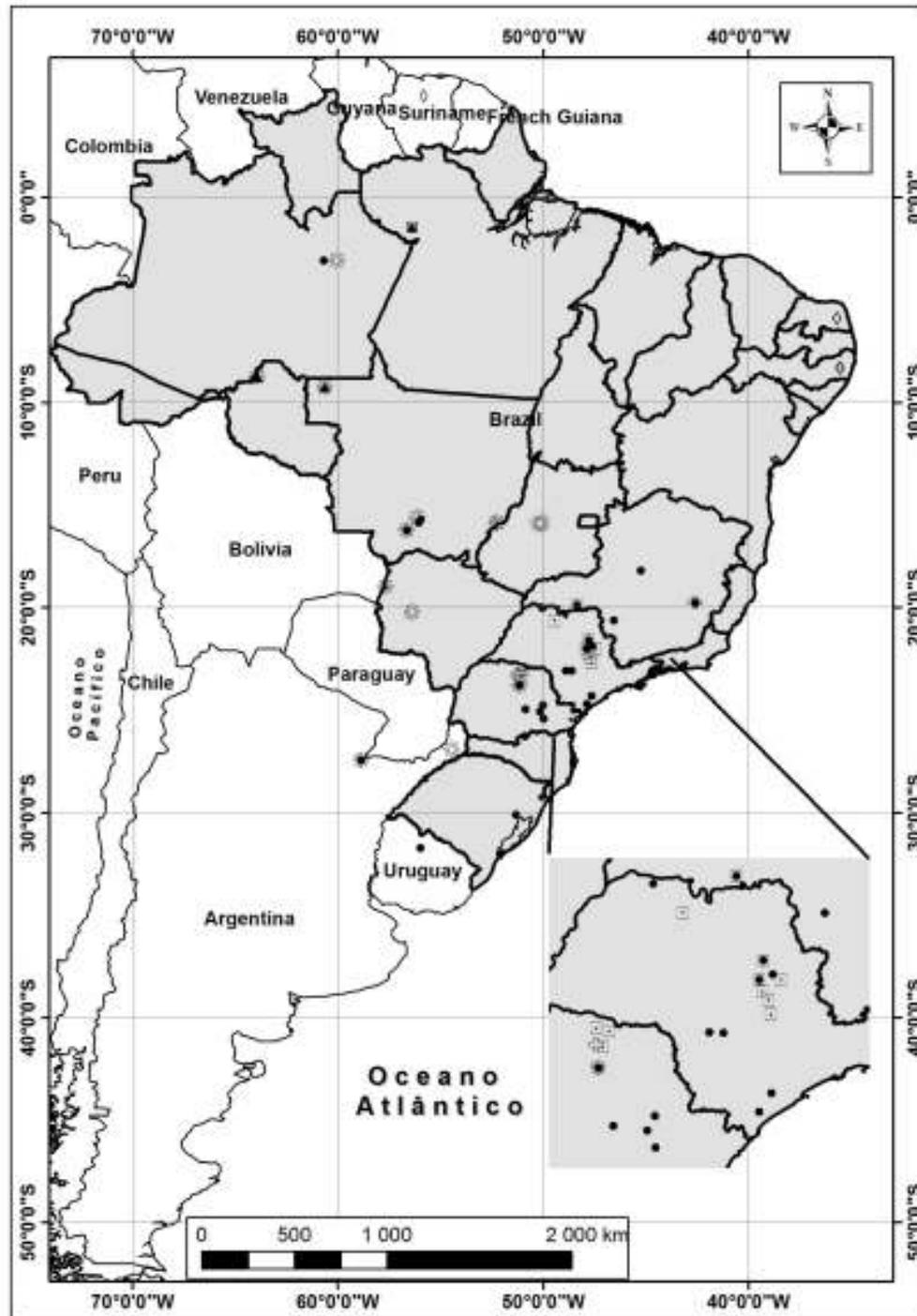


Figura 6. Distribuição dos diferentes cariomorfos descritos para *H. malabaricus*. De acordo com os símbolos tem-se:

- Cariomorfo A, + Cariomorfo B, \* Cariomorfo C, □ Cariomorfo D,
- ◊ Cariomorfo E, ◇ Cariomorfo F, ▲ Cariomorfo G

Tabela I. Locais de coleta de *Hoplias malabaricus* e seus respectivos citótipos (Dados obtidos de BERTOLLO *et al.*, 2000, com novas inserções de textos recentes).

Bacia Hidrográfica	Local de coleta	Região	2n	Sist. Cromos. sexuais	Cariomorfo	Ref.	
Bacia Amazônica	Rio Madeira	Porto Velho (RO)	40	-	C	1, 2	
			40♀; 41♂	XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	G	2	
			42	-	E	2	
	Rio Trombetas	Porto Trombetas (PA)	40♀; 41♂	XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	G	2	
	Rio Aripuanã	Aripuanã (MT)	40	-	C	1	
	Igarapé do Mindú - Rio Negro	Manaus (AM)	42	-	A	2, 11	
			40♀; 41♂	XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	G	2, 6	
	Bacia Araguaia-Mortes	Córrego Dois de Agosto	Araguaiana (MT)	40	-	C	1, 2
				42	-	A	2, 11
		Represa do Lobo	Itirapina (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	2, 6
Rio Mogi-Guaçu		Pirassununga (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	2, 8, 18	
Rio Passa-Cinco		Ipeúna (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	9	
Res. Água Vermelha: rio Grande		São João do Marinho (SP)	42	-	A	2	
Reservatório Volta Grande		Conceição das Alagoas (MG)	42	-	A	10	
			40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	10	
Ribeirão Barra Grande		Mirassolândia (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	2	
Rio Grande		Passos (MG)	42	-	A	11	
Rio Ivaí	Ivaí (PR)	42	-	A	20		
Lagoas: rio Mogi-Guaçu	Reserva Ecológica Jataí (SP)	42	-	A	9		
		40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	9		
Res. Jurumirim – Rio Paranapanema	Avaré (SP)	42	-	A	11		
	Itatinga (SP)	42	-	A	2		

Bacia do Alto Rio Paraná	EPUNOPAR: Rio Claro - Rio Paranapanema	Tamarana (PR)	42	-	A	21
			40	-	C	21
	EPUELR. Esperança - Rio Paranapanema	Londrina (PR)	42	XX/XY	B	21
	Rio Vermelho - Rio Paranapanema	Bela Vista do Paraíso (PR)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	21
		Rancho Alegre (PR)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	21
	C. Três Bocas Rio Paranapanema	Londrina (PR)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	21
		Iepê (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	21
	Rio Piracicaba	Piracicaba (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	9
	Fazenda Guaporé	São Carlos (SP)	42	-	A	11
	Res. UFSCar: ribeirão Monjolinho	São Carlos (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	2, 7, 8, 16
	Rio Pântano	Descalvado (SP)	40	-	A	16
	Rio Tibagi	Ponta Grossa (PR)	42	-	A	20
	Ribeirão Três Bocas	Londrina (PR)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	2
	Rio Araquá	Botucatu (SP)	42	-	A	18
	Rio Três Pontes	Novo Horizonte (SP)	40♀; 39♂	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> / X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	D	9
	Rio Aguapey	Corrientes – Argentina	42	-	A	3, 4
		40	-	C	4, 5	
Rio Paraná	Misiones – Argentina	40	-	C	3	
Rio Negro	Tacuarembó – Uruguai	42	-	A	2	
Lagoas isoladas	Aragarças (GO)	40	-	C	2	
Rio Vermelho	Goiás Velho (GO)	40	-	C	1	
Lagoa Carioca	Parque Est. do Rio Doce (MG)	42	-	A	15	
Lagoas: rio Doce	Parque Est. do Rio Doce (MG)	42	XX/XY	B	11, 12, 14, 15, 16	
Bacia do Rio Guatiba (Sul da	Córrego Bolaxa	42	-	A	11	

Costa Brasileira)	Rio Guaíba	Guaíba (RS)	42	-	A	2
Bacia do Rio Iguaçu	Rio Iguaçu	Palmeira (PR)	42	-	A	19, 20
		Poço Preto (SC)	42	-	A	2
Bacia do Rio Itapicuru (Bacia Isolada NE Brasil.)	Lagoa Redonda: Nízia Floresta	Natal (RN)	40	-	F	1, 2
		Lagoas: rio Bento Gomes	42	-	A	2
Bacia do Rio Paraguai	Lagoas: rio Cuiabá	Poconé (MT)	40	-	C	16
		Cuiabá (MT)	40	-	C	1, 2
		Miranda (MS)	40	-	C	1, 2
		Santo Antônio do Leverger (MT)	42	-	A	17
Bacia do Rio São Francisco	Rio Paraguai	Corumbá (MS)	40	-	C	1, 2
		Três Marias (MG)	42	-	A	2
Bacia do Rio Tocantins	Rio Tocantins	Tucuruí (PA)	40	-	F	1
		Juquiá (SP)	42	-	A	12
Bacia do Sudeste	Rio Ribeira	Castro (PR)	42	-	A	20
		Pariquera-Açu (SP)	42	-	A	20
		Ponta Grossa (PR)	42	-	A	20
Bacia Isolada – NE da América do Sul	Não citado	Paramaribo – Suriname	40	-	F	1
		Recife (PE)	40	-	F	1
Bacia Isolada NE brasileiro	Não citado	São Luiz (MA)	40	-	F	1

Referências: 1. Bertollo *et al.* (1997a); 2. Bertollo *et al.* (2000); 3. Lopes & Fenocchio (1994); 4. Lopes *et al.* (1998); 5. Jorge (1995); 6. Bertollo *et al.* (1983); 7. Dergam & Bertollo (1990); 8. Bertollo *et al.* (1997b); 9. Scavone *et al.* (1994); 10. Dergam (1996); 11. Born & Bertollo (2001); 12. Bertollo *et al.* (1979); 13. Ferreira *et al.* (1989); 14. Born & Bertollo (2000); 15. Born & Bertollo (2006); 16. Cioffi *et al.* (2009 a); 17. Cioffi *et al.* (2009 b); 18. Ferreira *et al.* (2007); 19. Vicari *et al.* (2003); 20. Vicari *et al.* (2005); 21. Rosa *et al.* (2009).

#### IV. Discussão

A correlação entre uma característica adaptativa e uma mudança cromossômica é muito difícil de ser estabelecida. Porém, pode-se observar que algumas alterações cromossômicas são mais frequentes em determinadas condições ambientais, sugerindo que esses diferentes rearranjos tenham valores adaptativos diferentes (GUERRA, 1988).

Os dados obtidos até o presente para *Hoplias malabaricus*, revelam uma grande diversidade cariotípica nas diferentes bacias hidrográficas (Tabela I). Entretanto, vários dos cariomorfos descritos ocorrem em simpatria e sem uma forma híbrida intermediária (BERTOLLO *et al.*, 1997a; BORN & BERTOLLO, 2006; DERGAM *et al.*, 1998; ROSA *et al.*, 2009), indicando que há isolamento reprodutivo entre as diferentes unidades estudadas. Assim, diante do conceito biológico de espécie, é provável que o complexo de espécies *H. malabaricus* (*sensu* DERGAM & BERTOLLO, 1990), na verdade se refere a um grupo de espécies crípticas.

A origem dessas “novas espécies” seguramente está intimamente relacionada a uma série de alterações cromossômicas, principalmente estruturais, que foram sendo fixadas nas diferentes populações graças ao isolamento reprodutivo entre elas. Deve-se recordar aqui que o complexo *Hoplias malabaricus* é representado por peixes com comportamento sedentário, ou seja, são organismos que não apresentam hábito migratório em cardumes. Diferente, por exemplo, de *Hoplias lacerdae*, que é representada por organismos caracteristicamente mais ágeis e propensos a deslocamentos maiores, os estudos cariotípicos revelaram números diplóides sempre constantes ( $2n=50$ ), baixa diversidade na morfologia dos cromossomos e constância na posição das regiões organizadoras de nucléolos (BERTOLLO *et al.*, 1978; MORELLI *et al.*, 2007, entre outros).

Segundo Guerra (1988), as alterações cromossômicas numéricas e estruturais podem afetar a adaptação do indivíduo de diversas maneiras: (a) alterando a expressão gênica, (b) ajustando a adaptação de sua descendência pelo aumento ou redução na frequência de recombinação e, ainda, (c) transformando uma população em subpopulações cromossomicamente incompatíveis, devido à restrição de fluxo gênico entre seus integrantes e, conseqüentemente, convergindo para especiação.

Além dessas diferenças cromossômicas, alguns autores têm destacado diferenças comportamentais entre as traíras do complexo *Hoplias malabaricus*. Por exemplo, o estudo citogenético realizado por Blanco *et al.* (2010) revela resultados interessantes sobre as conseqüências da transposição do rio Piumhi da bacia hidrográfica do Alto Rio

Paraná para a bacia do Rio São Francisco. Após a quebra da barreira natural por ação antrópica, várias espécies de peixes, antes isoladas, agora podem ser encontradas em contato, em ambas as bacias. Entre essas espécies, está *H. malabaricus*. A transposição do rio permitiu que o cariomorfo A (nativo da bacia do Alto Paraná) e o cariomorfo F (nativo da bacia do Rio São Francisco) passassem a ser encontrados em simpatria. Como consequência, os espécimes pertencentes ao cariomorfo F estão sendo excluídos por competição, uma vez que os espécimes do cariomorfo A, de acordo com os autores, são representados por organismos mais agressivos e, conseqüentemente, com uma habilidade maior para se dispersar.

De uma forma mais abrangente, pode-se afirmar que as alterações cromossômicas em *Hoplias malabaricus* são decorrentes do surgimento de barreiras reprodutivas, muitas vezes resultantes da fragmentação das populações. O isolamento geográfico causado pela fragmentação do habitat altera o fluxo gênico entre as populações e as tornam mais susceptíveis à deriva genética e/ou endogamia, o que pode levar a uma diversificação entre as populações replicadas da mesma fonte original (GALETTI Jr. *et al.*, 2008).

O isolamento reprodutivo também pode ser consequência de diferenças comportamentais. Uma característica interessante de *H. malabaricus* se refere à resistência por longo tempo a ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia), o que explica o seu sucesso adaptativo (RIOS *et al.*, 2005; RIOS *et al.*, 2006). Esse comportamento garantiu ao longo da história evolutiva do grupo, que pequenas populações fossem se ajustando à vida em pequenos ambientes isolados, criando assim as condições necessárias ao estabelecimento de vários dos cariomorfos hoje conhecidos.

De uma maneira mais ampla, a distribuição dos cariomorfos descritos para *Hoplias malabaricus*, parece estar intimamente ligada à história geológica da América do Sul, que passou por diferentes eventos resultantes de uma interação entre as incursões e regressões marinhas e soerguimento dos Andes. Durante esses diferentes momentos, os refúgios de água doce resultantes desses processos promoveram especiação alopátrica através de diversas bacias pelo estabelecimento de planícies de inundação desconectadas umas das outras (HUBERT & RENNO, 2006). Esse quadro que se estabeleceu no final do Mioceno, criou muitas das condições que culminaram com o estabelecimento de uma ictiofauna extremamente rica que é a ictiofauna de água doce Neotropical.

Paralelamente, o canal principal do Amazonas parece ter limitado a dispersão entre os tributários de cada margem do rio (HUBERT & RENNO, 2006). Assim, é de se crer que, em relação à *Hoplias*, as espécies basais que possivelmente deram origem às duas grandes unidades descritas por Bertollo *et al* (2000) (Grupo 1 – cariomorfos A, B, C e D; grupo 2 – cariomorfos E, F e G), parecem ter acompanhado esses eventos, pois pode-se observar que o primeiro grupo está bem distribuído na parte centro-sul brasileira, enquanto o segundo grupo está restrito a parte norte e nordeste brasileira (Figura 4). A partir desses eventos de especiação alopátrica, vários outros eventos de especiação simpátrica podem ter originado a grande diversidade cariotípica observada no complexo *Hoplias malabaricus*.

Os resultados obtidos no presente trabalho, não só confirmam a existência dessa complexa estrutura cariotípica, como também revelam uma forma cariotípica diferente das já descritas, bastante semelhante ao cariomorfo C (*sensu* BERTOLLO *et al.*, 2000), com  $2n=40$  cromossomos sem aparente mecanismo de cromossomos sexuais. Essas diferenças só puderam ser bem estabelecidas ao se utilizar metodologias citogenéticas mais resolutivas do que aquelas utilizadas por Bertollo *et al* (2000).

Uma particularidade que merece destaque no grupo estudado no presente trabalho se refere às variações detectadas na região heterocromática do par nº 14, principalmente nos machos, o que sugere o possível início de uma diferenciação sexual do tipo XX/XY, conforme um caso citado por Cioffi *et al.* (2009b) & Bertollo, L. A. C. (informação pessoal). No entanto, Vitorino *et al.* (em preparação), optaram por não citar tais variações como um mecanismo de cromossomos sexuais incipiente, uma vez que os estudos por eles realizados revelaram uma grande quantidade de blocos heterocromáticos com tamanhos muito variáveis (Figura 2 b,c,d), que podem refletir a existência de polimorfismos ainda mal estudados, que necessitam de um número muito grande de exemplares analisados para serem bem estabelecidos.

Entretanto, existem várias outras características que diferenciam o cariótipo estudado dos demais. Os espécimes pertencentes ao Cariomorfo C analisados por Cioffi *et al.* (2009a), apresentaram apenas um grande cístron de heterocromatina rica em pares de bases GC, enquanto os espécimes da população analisada confirmaram claramente várias outras regiões GC ricas evidenciadas pela CMA<sub>3</sub>.

Existem diferenças, ainda em relação aos sítios rDNA 18S, os quais foram mapeados em 10 cromossomos para a população do Cariomorfo C estudada por Cioffi *et al.* (2009a), sem a presença de sítios biteloméricos, enquanto que até oito sítios 18S e

a presença de pelo menos um par portador de sítios biteloméricos foram observados na população em discussão. Em relação à quantidade de sítios do DNA satélite 5SHindIII-DNA, foram observados 24 sítios no cariótipo estudado, enquanto que o cariomorfo C apresenta 22 sítios (Cioffi *et al.* 2009a). E, em relação ao rDNA 5S, o qual foi localizado em apenas um par cromossômico na população estudada, enquanto o Cariomorfo C apresenta dois pares portadores desse sítio ribossomal.

Dessa forma fica evidente que essa população de *Hoplias malabaricus* apresenta características peculiares fixadas em seu cariótipo, o que pode representar o resultado de pressões ambientais causadas pelo isolamento geográfico recente e conseqüente isolamento reprodutivo. Não se tem ainda um quadro bem definido sobre a “espécie” estudada, porém, pode-se sugerir que a diferenciação cariotípica observada é de difícil diagnose.

Mesmo assim, os dados indicam que a unidade analisada se encontra reprodutivamente isolada de qualquer outro grupo estudado de *Hoplias malabaricus* e representa uma unidade evolutiva independente, uma vez que o cariótipo pode ser considerado uma característica fenotípica de uma espécie, sendo bastante útil na resolução de incertezas taxonômicas.

Esse conhecimento é bastante importante, uma vez que fornece informações para o manejo e proteção adequada de uma espécie. Entretanto, os dados disponíveis, principalmente em relação à citogenética e a sua relação com o ambiente, têm sido pouco utilizados na conservação de populações naturais de peixes neotropicais (ARTONI & MATIELLO, 2003).

O complexo de espécies *Hoplias malabaricus* representa um modelo interessante a ser estudado. A partir dos primeiros estudos realizados por Bertollo *et al.* (1979), vários trabalhos se seguiram, na tentativa de se entender o que de fato ocorre com esse grupo de espécies ainda mal definidas. Da mesma forma, ainda não se sabe ao certo quais são os mecanismos que garantem a sobrevivência de tantas populações isoladas, ou se essas populações estão em depressão, ou ainda como elas se mantêm com poucos indivíduos, vencendo as barreiras estabelecidas pela possível endogamia elevada.

## V. Referências Bibliográficas

As referências desse capítulo se encontram no item Bibliografia Geral.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. A população de *Hoplias malabaricus* estudada no presente trabalho possui diversas características cromossômicas que só puderam ser discutidas após uma análise detalhada com base em marcadores cromossômicos básicos (coloração convencional com Giemsa, Ag-RONs e Bandas C) associada ao uso de marcadores moleculares mais resolutivos, como são os casos dos fluorocromos base específicos e FISH com sondas de DNAr 18S, DNA 5S e 5S*Hind*III-DNA.
2. Ainda que haja um estreito parentesco entre o grupo estudado com espécies portadoras do cariomorfo C, fica evidente que existem diferenças cromossômicas suficientes para caracterizá-lo como uma unidade evolutiva independente dentro do complexo *Hoplias malabaricus*.
3. A variação observada no par 14 é muito incipiente e por isso optou-se por não utilizá-la para se propor a ocorrência de um mecanismo de cromossomos sexuais. É possível que ela represente o início de um processo de diferenciação desses elementos.
4. Os cariomorfos basais que possivelmente deram origem às duas grandes unidades descritas por Bertollo *et al* (2000) (Grupo 1 – cariomorfos A, B, C e D; grupo 2 – cariomorfos E, F e G), tem suas origens associadas aos eventos de incursões e regressões marinhas que isolaram por completo o escudo das Guianas e Planalto Central do Brasil, no final do Mioceno, pois observa-se que o primeiro grupo está bem distribuído na parte centro-sul, enquanto o segundo grupo está restrito a parte norte e nordeste brasileira.

**BIBLIOGRAFIA GERAL**

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; Stocker, A. J.; Foresti, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. (1996). Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). **Chromosome Research**, 4: 301-305.

AMEMIYA, T. e GOLD, J. R. (1986). Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. **Copeia**, 1: 226-231.

ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C. e GALETTI Jr., P. M. (1999). Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genetic and Molecular Biology**, 22(1):39-44.

ARTONI, R.F.; MATIELLO, M. C. A. 2003. Genética de peixes neotropicais. I. Aspectos da conservação genética dos peixes no parque estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. Publicação UEPG **Ciências Biológicas e da Saúde** (9) 2: 7-15.

ARTONI; R. F. VICARI, M. R., BERTOLLO, L. A. C. (2000). Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, 6(1): 43-60.

BERTOLLO, L. A. C. (1978). **Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae)**. Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Departamento de Genética e Matemática aplicada à Biologia, 164p.

BERTOLLO, L. A. C. (1996). The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. an uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia**, v. 61 (1), p. 75-81.

BERTOLLO, L. A. C.; BORN, G. G.; DERGAM, J. A. ; FENOCCHIO, A. S.; MOREIRA FILHO, O. (2000) A biodiversity approach in the neotropical fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8 (7), p. 603-613.

BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. (1997b). The  $X_1X_2Y$  sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding.. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499.

BERTOLLO, L. A. C.; MESTRINER, C. A. (1998). The  $X_1X_2Y$  sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses.. **Chromosome Research**, v. 6, p. 141-147.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology** 28, 153-159.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética I**, 2: 103-120.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae).. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 2, n. 1, p. 17-37.

BERTOLLO, L. A. C. ; TAKAHASHI, C. S. ; MOREIRA FILHO, O. (1983). Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, v. 48, p. 1-12

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M. S. (1997a). Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): cytotype with  $2n=40$  chromosome. **Brazilian Journal Genetic**, 20(2): 237-242.

BIERREGAARD-JR, R.O., LOVEJOY, T. E., KAPOV, V., SANTOS, A. A., HUTCHINGS, R. W. 1992. The Biological Dynamics of Tropical Rainforest Fragments. **BioScience**. 42:859-866.

BLANCO, D.; LUI, R. L.; BERTOLLO, L. A. C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. 2010. Characterization of invasive fish species in a river transposition region:

evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 20: 1-8.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. (2000). An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, v. 8, p. 111-118.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. (2001). Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. cytotypes with  $2n=42$  chromosomes.. **Genetica (The Hague)**, v. 110, p. 1-9.

BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. (2006). A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Biology**, 66(1B): 205-210.

BRINN, M. N. A.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas**, 141: 252-257.

BRITSKI, H. A., SATO, Y. and ROSA, A. B. S. (1986). **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias**. 2 ed. End. Codevasf, Brasília, pp.115.

BRUM, M. J. I. (1995). Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. Soc. Bras. de Gen. **Série Monografias**, 2: 5-42.

CERQUEIRA, R.; BRANT, A.; NASCIMENTO, M. T.; PARDINI, R. 2003. Fragmentação: alguns conceitos. pp. 23-40. In: **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. Brasília: MMA/SBF. 510 p.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. (2010). Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an  $X_1X_2Y$  sex chromosome system in this fish group. **Heredity**, 1-8.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. (2009a). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, **10**: 34. doi:10.1186/1471-2156-10-34

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; CENTOFANTE, L.; JACOBINA, U.; BERTOLLO, L. A. C. (2009b). Chromosomal Variability among Allopatric Populations of Erythrinidae Fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of Three Classes of Repetitive DNAs. **Cytogenetics and Genome Research**, 125:132–141. DOI: 10.1159/000227838.

DERGAM, J. A. (1996). **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex**. Tese de PhD. Colorado State University, USA.

DERGAM, J. A. ; BERTOLLO, L. A. C. (1990). Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the Sao Francisco and Alto Parana Basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, 13(4): 755-766.

DERGAM, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; SILVA, L. F. D.; JÚLIO, H. F.; CAETANO, L. G.; BLACK, W. C. (1998). Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) in the Iguassu, Tibagi, and Paraná rivers. **Genetics and Molecular Biology**, **21**: 493-496.

EGOZCUE, J. (1971). **Técnicas em Citogenética**. Editorial Espaxs, Barcelona, pp.144.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRANCO, M. B. C.; FRACÁCIO, R.; GUNTZEL, A. M.; MORETTO, E. M.; PEREIRA, R. H. G.; RIETZLER, A. C.; ROCHA, O.; RODGHER, S.; SMITH, W. S.; TAVARES, K. S. 2003. Organismos Aquáticos. pp. 201-238. In: **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. Brasília: MMA/SBF. 510 p.

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

FERREIRA, R. R. H.; FONSECA, C. O. ; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F. (1989). Cytogenetics of fishes from Parque Florestal do Rio Doce (MG). I. preliminary study of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) from Lagoa Carioca and Lagoa dos Patos. **Brazilian Journal of Genetics**, 12 (2): 219-226.

GALETTI Jr., P. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (1994). Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia** 47: 289-297.

GALETTI Jr., P. M.; MARTINS, C. (2004). Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Capítulo 3. *In*: GUERRA, M. S. (Org.). **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p.61-88.

GALETTI Jr., P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A. M.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S. N.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. (2008). Genética da conservação na biodiversidade brasileira. pp.199-229. *In*: **Fundamentos da Genética da Conservação**. Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 280 p.

GALETTI, P. M.; FORESTI, F.; BERTOLLO L. A. C.; MOREIRA O. (1984) Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. **Caryologia** 4: 401-406.

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

GUERRA, M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 142 p.

GUERRA, M. (2004). Hibridação *in situ*: princípios básicos. *In*: GUERRA, M. S. (Org.). **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 176 p.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Biomedical and Life Sciences**, 36 (8): 1014-1015.

HUBERT, N.; RENNO, J. F. (2006). Historical biogeography of south American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, 33: 1414-1436.

IMAI, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukariotic chromosomal evolution na their cytological meaning. **Japanese Journal of Genetics** 66: 635-661.

JORGE, L. C. (1995). **Estudos citogenéticos comparativo de algumas espécies de peixes da região de Corrientes – Argentina com as do Alto Paraná**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

KIPLING, D.; WARBURTON, P. E. 1997. Centromeres, CENP-B and *Tigger* too. **Trends in Genetics**, 13 (4): 141-145.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220.

LIMA, C. B.; ALMEIDA, F. B.; CONCEIÇÃO, G. D.; FERANDES, A.; DERGAM, J. A. (2008). Divergência genética em *Hoplias malabaricus* em uma região limite entre as Bacias Amazônica e do Alto Paraguai. **Resumos do IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais**. Brasília, DF.

LOPES, P. A.; ALBERDI, A. J.; DERGAM, J. A.; FENOCCHIO, A. S. 1998. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey river (Province of Corrientes, Argentina). **Copeia** 1998: 485-487.

LOPES, P. A.; FENOCCHIO, A. S. 1994. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). **Cytobios** 80: 217-221.

LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent in situ hybridization. **Chromosome Research** 6: 621-628.

LOWE-MACCONNELL, R. H. (1999). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo. 521p.

MARGARIDO VP (1995) **Uma contribuição à Citogenética dos Bryconinae (Characiformes, Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP. 115p.

MARGARIDO, V. P. GALETTI, P. M. 2000. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**, 23 (3): 569-573.

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

MARTINS, C.; FERREIRA, I. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI, P. M. Jr. (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.; GALETTI, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7: 363-367.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P.M. (2001a). Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome** 44: 903–910.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P.M. (2001b). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica** 111: 439–446.

MARTINS, C.; WASKO, A. P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C. R. **Focus on Genome Research**. 335-363.

MATHEY, R. 1949. **Les chromosomes des Vertébrés**. Lausanne: Rouge.

MENEZES, N. A. (1972). Distribuição e Origem da Fauna de Peixes de Água Doce das Grandes Bacias Fluviais do Brasil. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca de C.P.R.N. da Secretária da Agricultura. pp. 73-78.

MILLER, E. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O. J. (1976). Supression of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**, 101: 235-243.

MORAES, A. P. (2007). **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus***. Tese de Doutorado. Biologia Vegetal. Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE.

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

NEVES, J. ; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. (2003). Novo Citótipo em *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). In: **Anais do XI Encontro de Iniciação Científica, 2003, Cuiabá - MT**. p. 151-151.

NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. (2006). **Citogenética de peces**. 1 ed. Caracas: Universidad de Oriente. 212 p.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (1994). Revisão de estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In **Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, V**, Botucatu (SP), p.6.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO FILHO, S.A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, 11: 577-624.

PHILLIPS, R. (2001). Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) to fish genetics and genome mapping. **Marine Biotechnology**, 3: S145–S152.

PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture**, 140: 197-216.

PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. S. (1998). Heterocromatina constitutiva. Soc. Bras. de Gen. **Série Monografias**, 7: 185-225.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of National Academy Sciences**. 83: 2934-2938.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. (2004). Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Def. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Florestalis**, 65: 40-48.

RIOS, F. S.; MORAES, G.; OBA, E. T.; FERNANDES, M. N.; DONATTI, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. (2006). Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding. **Journal of Comparative Physiology B**, 176:721–728. DOI 10.1007/s00360-006-0098-3.

RIOS, F. S.; OBA, E. T.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. (2005). Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in

the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology A** 140: 281– 287.

ROSA, R.; CAETANO-FILHO, M.; SHIBATTA, O. A.; GIULIANO-CAETANO, L. 2009. Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias* aff. *malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin. **Journal of Fish Biology**, 75: 2682–2694. DOI:10.1111/j.1095-8649.2009.02467.

SANTOS, U.; WACHLEVSKI<sup>1</sup>; M.; DERGAM, J. A. 2007. Caracterização e comparação citogenética em população de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) no Rio Pará: Bacia do Alto São Francisco, MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu – MG.

SCAVONE, M. D. P.; BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLINI, M.M. 1994. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios** 80: 223-227.

SCHMID, M. (1978). Chromosome Banding in Amphibia. I. Constitutive Heterochromatin and Nucleolus Organizer Regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** (Bed.) 66: 361-388.

SCHMID, M. (1980a). Chromosome Banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-Rich Chromosome Regions in Anura. **Chromosoma** (Berl.) 77: 83-103.

SCHMID M. (1980b). **Chromosome evolution in Amphibia**. In: Miiller H (ed) **Cytogenetics of vertebrates**. Birkhfiuser, Basel, pp 4-27.

SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma** (Berl) 97:101-114.

SCHMID, M.; KRONE, W. (1976). The Relationship of a Specific Chromosomal Region to the Development of the Acrosome. **Chromosoma** (Berl), 56: 327-347.

SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and Dapi. **Chromosoma** (Berl.), 58:307-324.

SCZEPANSKI, T. S. (2008). **Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (Teleostei, Siluriformes) pertencentes ao Litoral paranaense**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR.

SOUZA, I.L., VENERE, P. C.; MOREIRA FILHO, O. (2007). Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphisms in the small characid fish *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842). **Cytologia**, 72: 63 - 69.

SOUZA, I. L.; SANTOS-SILVA, L. K.; VENERE,P. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2008). Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, DOI :10.1016/j.micron.2007.09.007

SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experiment Cell Research**, 75: 304-306.

VENERE, P. C.&GALETTI JR, P. M. (1989). Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Revista Brasileira de Genética**, 12 (1): 17-25.

VENERE, P. C.; PFISTER, S. C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P. M. (1997) Chromosomal characterization in Characinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **Cytobios** 92: 123-131.

VENERE, P. C.; SOUZA, I. L.; SILVA, L. K. S.; ANJOS, M. B.; OLIVEIRA, R. R.; GALETTI JUNIOR, P. M. (2008). Recent chromosome diversification in the evolutionary irradiation of the freshwater fish Curimatidae. **Journal of Fish Biology**, 72: 1976-1989.

VICARI, M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenetics and Genome Research**, 101:24–28. DOI: 10.1159/000073413.

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

VITORINO, C. A.; VENERE, P. C.; SOUZA, I. L. (2008). Citogeografia de *Hoplias malabaricus* (traíra) do Médio Araguaia. In: XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Uberlândia - MG. **Anais do XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**.

WALLRATH, L. L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. **Current Opinion in Genetics & Development** 8: 147-153.

## VII. ANEXOS

### VII.1 Preparação de cromossômicos mitóticos (Técnica Convencional)

Para a obtenção de cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica descrita por Egozcue (1971) e modificada por Bertollo *et al.* (1978). A metodologia consiste nos seguintes passos:

1. Injetar no abdome, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,0125%) na proporção de 1mL/100g de peso do animal.
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 20 minutos a 1 hora, sacrificá-lo em seguida, retirando o rim (anterior e/ou posterior) ou, no caso de animais muito pequenos, retirar todo o conjunto de órgãos, exceto vesícula biliar, sob estereomicroscópio.
3. Lavar rapidamente o material retirado em solução hipotônica de KCl a 0,075M e transferi-lo para pequenas cubas de vidro contendo solução hipotônica (cerca de 8mL).
4. Dissociar bem o material, com pinças de dissecação e uma seringa desprovida de agulha (de preferência de vidro), aspirando e expirando suavemente para facilitar a separação das células e para obter uma solução celular homogênea.
5. Colocar a suspensão obtida em estufa a 36 – 37°C, durante cerca de vinte e cinco – trinta minutos.
6. Ressuspender o material com bastante cuidado, com auxílio de pipeta Pasteur, e transferir a solução obtida para um tubo de centrifuga. Pedacos de tecidos ainda não desfeitos devem ser descartados.
7. Acrescentar algumas gotas de fixador (álcool metílico 3:1 ácido acético), recém-preparado. Ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos, a 900rpm, descartando o sobrenadante com uma pipeta Pasteur.
8. Adicionar, vagarosamente, 5-7ml de fixador recém-preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo de centrifuga.
9. Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur.
10. Repetir os itens 8 e 9 por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar cerca de 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material sedimentado, e ressuspender bem o material. Este poderá ser então guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo “Eppendorf”, ou trabalhado conforme os seguintes passos:

11. Pingar 3-4 gotas da suspensão obtida sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa e seca que deve estar sobre uma placa aquecida a 38-39°C ou sobre uma lâmina que deve ter sido mergulhada e aquecida a 60°C, formando assim uma camada fina de água sobre esta, ou ainda sobre uma lâmina colocada sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C.
12. Deixar secar naturalmente (pode ser colocada na frente de um ventilador para apressar a secagem).
13. Corar com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 8-10 minutos.
14. Lavar a lâmina com água destilada ou água corrente e deixar secar ao ar.

## **VII. 2. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)**

Para localização das regiões organizadoras de nucléolos utilizou-se a técnica de impregnação pela prata de Howell & Black (1980), que consiste em:

1. Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 4 gotas de solução aquosa de gelatina, 3 gotas de nitrato de prata e 2 gotas de água destilada. Misturar e cobrir com uma lamínula.
2. Incubar em estufa a 60°C, sobre um suporte, por um período de 2-3 minutos, até que a lâmina obtenha uma tonalidade marron-clara.
3. Deixar a lamínula escorrer debaixo de água corrente.
4. Secar a lâmina e corar com Giemsa diluída a 5% por 5-10 segundos.
5. Observar ao microscópio.

## **VII. 3. Técnica para detecção da heterocromatina constitutiva (HC)**

Para detecção da heterocromatina constitutiva, utilizou-se a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas alterações, como citado a seguir:

1. Pingar sobre uma lâmina nova e bem limpa, 2 ou 3 gotas de suspensão celular, deixar secar por cerca de 10 minutos;
2. Tratar a lâmina com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 5 minutos, em temperatura ambiente. Lavar com água destilada e deixar secar por 5 minutos.
3. Incubar a lâmina em solução de hidróxido de bário  $[Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O]$  a 5% recém preparada e filtrada, em banho-maria a 42°C, durante 1 minuto.

4. Lavar rapidamente em HCl 0,2N, para interromper a ação da solução e retirar o excesso de hidróxido de bário e depois lavar com água destilada. Deixar secar ao ar por alguns minutos.
5. Incubar em solução 2XSSC, a 60°C, previamente aquecida, por 1 hora. Lavar em água destilada e deixar secar.
6. Corar com solução Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos. Lavar com água e deixar secar.

#### **VII. 4. Técnica para coloração com o fluorocromo base-específico Cromomicina A<sub>3</sub>**

Para detecção das regiões ricas em pares de base GC utilizou-se a técnica descrita por Schweizer (1976), que consiste em:

1. Colocar as lâminas, preparadas segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, em cubetas, numa solução de tampão McIlvaine +MgCl<sub>2</sub> à temperatura ambiente por 10 minutos;
2. Retirar as lâminas e escorrer o excesso de tampão, secando o lado de trás com papel absorvente. Adicionar, 150µl da solução de cromomicina A<sub>3</sub> (dissolver 5mg de cromomicina em 10ml de tampão McIlvaine diluído 1:1 em água destilada), cobrir o conjunto com uma lamínula e deixar corando por 15 minutos no escuro.
3. Retirar as lamínulas em tampão McIlvaine lavando as lâminas vagarosamente nesta solução (Deixar as lâminas neste tampão enquanto prepara a solução Methyl-greem/Hepes);
4. Incubar as lâminas em solução Methyl-greem/Hepes (recém preparada) por 15 minutos;
5. Lavar as lâminas em solução Hepes/NaCl;
6. Secar as lâminas, pingar uma solução de glicerol com propilgalato e colocar lamínula para a montagem das lâminas permanentes (depois de dois dias de descanso);
7. Deixar as lâminas guardadas em geladeira, por um período de cerca de 30 dias, para a estabilização do fluorocromo, e analisá-la em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490nm (zona de excitação do azul)

#### **VII. 5. Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)**

Para a hibridação das sondas de rDNA 5S, rDNA 18S e da sequência 5SHindIII-DNA isoladas do genoma de *H. malabaricus*, utilizou-se o protocolo descrito a seguir, o qual

se baseia nos procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986) com modificações apresentadas por Martins e Galetti (2001).

### **Marcação da sonda**

A sonda deverá ser marcada pelo método de *nick translation* utilizando o Kit *BioNick<sup>TM</sup> Labeling System* (Invitrogen), que segue os seguintes passos:

- a) Preparar um mix contendo:
  - 1 $\mu$ L 10x dNTP mix;
  - 1 $\mu$ L do DNA sonda (200ng/ $\mu$ L);
  - 1 $\mu$ L do mix de enzima;
  - 6 $\mu$ L de água Milli Q.
- b) misturar bem, centrifugar brevemente e incubar a 16° C por duas horas;
- c) adicionar 1 $\mu$ L de stop buffer, 1 $\mu$ L de acetato de sódio 3M e 22 $\mu$ L de etanol 100% gelado;
- d) misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70° C por 1 hora;
- e) centrifugar por 15 minutos a 15.000rpm a 4° C;
- f) descartar o sobrenadante e adicionar 50 $\mu$ L de etanol 70% gelado;
- g) centrifugar por 5 minutos a 15.000rpm a 4° C;
- h) descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
- i) ressuspender em 12 $\mu$ L de água Milli Q.

### **Tratamento das lâminas**

As lâminas podem ser preparadas com um dia de antecedência ou no momento do tratamento, como segue (descrição para o tratamento de uma lâmina):

- a) Colocar 100 $\mu$ L de RNase 40 $\mu$ g/mL (0,4 $\mu$ L de RNase 10mg/mL e 99,6 $\mu$ L de 2xSSC) sobre a lamínula, aderir a lâmina sobre esta lamínula e deixar em câmara úmida (umidecida com 2xSSC) a 37° C por 1 hora e 30 minutos;
- b) Lavar a lâmina duas vezes em 2xSSC durante 10 minutos cada;
- c) Desidratá-las em série alcoólica 70%, 85% e 100% gelado durante 10 minutos cada;

- d) Mergulhar a lâmina em formamida 70% em 2xSSC por 4 minutos a 70° C (guardar a formamida para reutilizá-la no dia seguinte);
- e) Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100% a – 20° C por 5 minutos cada (este passo é muito importante, pois as lâminas devem ser passadas rapidamente da formamida para o álcool). Deixar secar ao ar.

### **Solução de hibridação**

Em um tubo Eppendorf contendo 12 ul da sonda adicionar 30µL de formamida (concentração final 50%), 12µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 6µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Desnaturar a sonda a 95° C por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo.

### **Hibridação**

Colocar 60µL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37° C *overnight*.

### **Lavagens**

Lavar em 2xSSC em temperatura ambiente apenas para tirar a lamínula e escorrer bem a lâmina sem deixar secar. Deste momento em diante as lâminas não podem secar:

- a) Lavar em formamida 50%/2XSSC por 15 minutos a 37° C (utilizar a mesma solução do dia anterior – formamida 70% e transformá-la para 50%);
- b) Lavar em 2xSSC por 15 minutos a 37° C por uma vez;
- c) Lavar em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente;
- d) Lavar em 4xSSC à temperatura ambiente (só para enxaguar).

### **Deteção e amplificação do sinal da sonda**

- a) Sobre uma lamínula colocar 0,1µL de avidina-FITC 0,07% em 70µL de tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15M de NaCl);
- b) inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37° C;

- c) após este tempo, lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada, com agitação, em tampão de bloqueio ( $\text{NaHCO}_3$  1.26% / citrato de sódio 0,018% / Triton 0,0386% em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1%) recém-preparado a 42° C. Escorrer a lâmina e secá-la por baixo;
- d) sobre uma lamínula colocar 80 $\mu\text{L}$  de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2 $\mu\text{L}$  de anti-avidina estoque em 78  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio), inverter a lâmina sobre a lamínula e deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37° C por 30 minutos;
- e) novamente lavar em tampão de bloqueio três vezes por 5 minutos cada com agitação a 42°C;
- f) repetir os passos de (a) até (e);
- g) aplicar novamente o FITC e fazer as lavagens como descrito no passo (e);
- h) lavar em 4xSSC/Triton 2% duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- i) lavar em 4xSSC/Triton 0,2% duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- j) escorrer as lâminas e deixar secando ao ar.

### **Montagem das lâminas**

Secar a lâmina e montar com iodeto de propídio na proporção de 20 $\mu\text{L}$  de meio de montagem *antifading* com 0,7 $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de propídio a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .