



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias
malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE
ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS
DA BACIA AMAZÔNICA**

FABÍOLA ARAÚJO DOS SANTOS

**SANTARÉM, PARÁ
2012**

FABÍOLA ARAÚJO DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS DA BACIA AMAZÔNICA

ORIENTADOR: PROF.Dr. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao programa de pós graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade.

**SANTARÉM, PARÁ
2012**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Gestão da Informação – SIGI/UFOPA

-
- S237c Santos, Fabíola Araújo dos
Caracterização citogenômica em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) provenientes de rios de águas brancas, águas claras e águas pretas da Bacia Amazônica / Fabíola Araújo dos Santos. – Santarém, 2012.
71 f.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientador Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2012.
1. Ictiologia. 2. Peixe. 3. Bacia Amazônica. 4. Espécie de *Hoplias malabaricus*. 5. Traíra. 6. Água branca. 7. Água clara. 8. Água preta. I. Rodrigues, Luís Reginaldo Ribeiro, orient. II. Título.

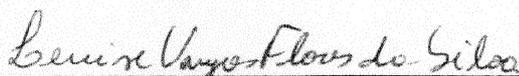
CDD: 23 ed. 597

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS DA BACIA AMAZÔNICA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Genética e Conservação da Biodiversidade Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 11 de maio de 2012.

Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)
Coordenador do PGRNA

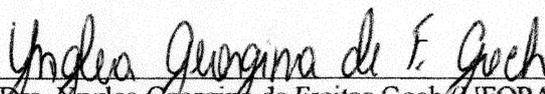
Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:



Prof. Dra. Lenise Flores da Silva (UFOPA/ICTA)
Examinadora 01



Prof. Dr. Rui Bessa Lopes (UFOPA/ICTA)
Examinador 02



Prof. Dra. Ynglea Georgina de Freitas Goch (UFOPA/ICTA)
Examinadora 03



Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)
Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais Alda e Enoque, aos meus irmãos Fabrício e Rafael, e ao Wandson, pelo apoio, dedicação, companheirismo e muito Amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me dar forças e possibilitar tantas graças em minha vida.

Aos meus pais, Alda e Enoque, simplesmente por tudo, pela vida, por todo amor, pelo apoio perante minhas decisões e por serem minha base para tudo, AMO VOCÊS!

Ao Wandson, por todo amor, carinho e compreensão e principalmente por estar ao meu lado durante a realização deste trabalho, o que tornou esta etapa da minha vida um pouco mais fácil.

Aos meus irmãos Rafa e Brício, pelo incentivo.

Ao meu orientador, prof^o Luís Reginaldo, por acreditar em mim, por tudo o que me ensinou, me corrigiu, me orientou e pela convivência no dia a dia e por ter toda a paciência do mundo comigo. Não consigo enxergar um orientador melhor, agradeço também pelo apoio e compreensão pessoal que ele sempre cultivou.

À prof^a Eliana Feldberg, pela acolhida em seu laboratório no INPA, por ter proporcionado condições para realização deste trabalho em seu laboratório, e pela disponibilidade em ajudar em tudo que precisei quando estive em Manaus.

À Leandra Terêncio e Carlos Schneider, do laboratório de Citogenética Animal-INPA, pela ajuda nas etapas de captura das imagens de FISH.

À Dona Marilda e seu Dalvesco pela hospedagem em sua casa em Manaus, durante parte do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por tudo!

Aos amigos do LGBio-UFOPA pelo companheirismo, momentos de descontração e pela prazerosa convivência: Erika, Aline, Talita Cunha, Talita Ribas, Vinicius, Diego.

Um agradecimento especial ao Diego, Erika e Rafael pela ajuda nas coletas de campo.

Também gostaria de agradecer à Eloiza e Beatriz pela amizade e companheirismo. Apesar da distância estão sempre presentes. Sinto falta de vocês!

À FAPESPA pelo apoio financeiro na modalidade de bolsa de mestrado a mim concedida.

À FAPEAM pelo apoio financeiro concedido a Dra. Eliana Feldberg (INPA), Projeto “Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais”, que subsidiou o presente trabalho.

Ao INCT-Adapta Amazônia (CNPq) pelo apoio financeiro na aquisição de materiais de consumo.

À Universidade Federal do Oeste do Pará e ao Programa de Pós-Graduação, pelo apoio e suporte durante a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!!!

“Uma das principais razões do êxito na vida é a habilidade de manter um interesse diário pelo trabalho que se faz, de ter um entusiasmo crônico de considerar cada dia especialmente importante”.

(W.L. Phelps)

Santos, Fabíola Araújo. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS DA BACIA AMAZÔNICA. 2012. 69 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia – Programa de Pós-Graduação em Recursos naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2012.

RESUMO

A bacia Amazônica possui uma alta diversidade de espécies de peixes, distribuídos em diferentes tipos de ambientes aquáticos. Entre os vários fatores que servem para distinguir tais ambientes podemos destacar a coloração das águas dos rios, que são classificadas em rios de águas brancas, águas claras e águas pretas. O presente estudo teve como objetivo analisar espécimes de *Hoplias malabaricus* nesses diferentes ambientes por meio de marcadores citogenéticos clássicos (bandeamento C e NOR) e moleculares (fluorocromo Cromomicina A3 e FISH). Nas hibridizações *in situ* utilizou-se sondas DNAr 5S e 18S e do elemento transponível *Rex 3*. Foram analisados 60 indivíduos coletados no Rio Amazonas (água branca), no Rio Negro (água preta) e no Rio Tapajós (água Clara). Todos os espécimes apresentaram número diplóide de $2n=40$ cromossomos, com fórmula cariotípica de $20M+20SM$ para ambos os sexos. Pequenos blocos de heterocromatina constitutiva foram observados nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e nas regiões distais de alguns pares. Um conspícuo bloco heterocromático foi observado na região pericentromérica do par 14. A coloração com nitrato de prata mostrou quatro sítios de NOR, sendo observada marcação bitelomérica apenas na população da água preta. As regiões ricas em GC variaram de três a seis cromossomos marcados. Em relação à localização do gene DNAr5S, foi mapeado na região centromérica do par 15 e subtelomérica do par 14, já o gene DNAr18S apresentou seis sítios nas populações da água branca e clara e três sítios marcados na população da água preta. A localização cromossômica *Rex 3* apresentou três padrões claramente distintos. Em amostra proveniente de água branca, este marcador foi detectado nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e distais de alguns pares, exibindo um padrão semelhante ao obtido por bandeamento C. Enquanto que, em

amostras provenientes de ambientes de água clara o marcador *Rex 3* foi detectado nas regiões teloméricas em quase todos os cromossomos e centromérica em alguns, na água preta foi evidenciado em alguns pares cromossômicos. As diferenças citogenéticas encontradas em *Hoplias malabaricus* nos três ambientes amazônicos estudados podem estar relacionadas a um padrão de adaptação desse organismo nesses ambientes.

Palavras-chave: elemento transponível, Hibridização *in situ*, DNA repetitivo, *Hoplias malabaricus*.

Santos, Fabíola Araújo. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS DA BACIA AMAZÔNICA. 2012. 69 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia – Programa de Pós-Graduação em Recursos naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2012.

ABSTRACT

The Amazon basin has a high diversity of fish species, distributed around different aquatic environments. Among the many factors that determine such Amazonian environments we can highlight the water colors of the rivers, which are classified in white water, clear water and black water rivers. The present study aimed to analyze specimens of *Hoplias malabaricus* in these different environments by means of classical (C and NOR banding) and molecular cytogenetic markers Cromomycin A3 and FISH using DNAr5S e 18S genes and transposable element Rex 3 probes. We analyzed 60 individuals collected from the Amazon River (white water), Negro River (black water) and Tapajós River (clear water). All the specimens showed a diploid number of $2n = 40$ chromosomes with a karyotype formulae $20M + 20SM$ in both the sexes. Small blocks of heterochromatin in the centromeric regions of all chromosomes and the distal regions of some pairs were detected. Staining with silver nitrate in the three environments ranged from four sites of NOR, being observed demarcation bitelomeric just in the population of the black water. The rich regions in GC varied from three to six marked chromosomes. Regarding to the location of the gene DNAr5S, it was mapped in the pairs 14 and 15. Already the gene 18S presented six sites in the populations of the white and clear water and three sites marked in the population of the black water. The chromosomal location of the Rex 3 probe showed three clearly distinct patterns. In a sample from white water, this marker was detected in the centromeres of all chromosomes and distal few pairs, showing a similar pattern to that obtained by banding C. While in samples from the clear water environments Rex 3 marker was detected in almost all regions of telomeric and centromeric chromosomes of some, the black water was found in only a few chromosome pairs. The cytogenetic differences found in *H. malabaricus* in three Amazonian environments studied may be related to a pattern of adaptation of this organism in these environments.

Keywords: in situ hybridization, *Hoplias malabaricus*, repetitive DNA, transposable element

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xi
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1.1 Heterogeneidade ambiental na bacia amazônica.....	2
1.1.2 Elementos de DNA repetitivo no genoma eucarioto.....	4
1.1.2.1 Sequências de DNA repetitivo <i>in tandem</i>	5
1.1.2.2 Sequências repetidas dispersas	6
1.1.2.2.1 Elementos transponíveis em peixes	8
1.1.2.3 Famílias Multigênicas	11
1.1.3 Aspectos biológicos e citogenéticos de <i>Hoplias malabaricus</i>	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
4 CAPITULO 1.....	30
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
5 CONCLUSÃO.....	49
6 ANEXOS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2n=: Número diplóide

Ag-NOR: Região organizadora de nucléolo argenteoflica

Banda C: Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva

CMA3: Cromomicina A₃

DAPI: Diamidinofenilindol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAc: DNA complementar

DNAr: DNA ribossomal

dNTP: Desoxirribonucleotídeo

FISH: Hibridização fluorescente *in situ*

GC: Guanina e citosina

FITC: Fluoresceína isotiocianato

LTR: *Long terminal repeats*

LINES: *Long interspersed nuclear element*

M: Metacêntrico

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MITEs: *Miniature inverted transposable element*

NOR: Região organizadora de nucléolo

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pb: Pares de bases

RNA: Ácido ribonucleico

RNAr: RNA ribossomal

SM: Submetacêntrico

SINEs: Inglês *short interspersed nuclear elements*

TEs: Elementos transponíveis

VNTR: *Variable number of tandem repeats*

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ictiofauna amazônica é muito rica, estima-se que cerca de 3.000 espécies habitam os mais diferentes ambientes encontrados na bacia (Barthem, 2001). Esses ambientes são caracterizados por diferentes estruturas geológicas e tipos de água estando estes, anualmente submetidos a elevadas mudanças ocasionadas pelo pulso de inundação, favorecendo assim a grande heterogeneidade de ambientes.

Diante desta diversidade de hábitat a biota aquática tem se adaptado às condições propostas pelo ambiente, essas adaptações podem ser verificadas na morfologia, anatomia, fisiologia e também na genética desses organismos (Junk *et al.*, 1989; Almeida-Val & Farias, 1996). Atualmente tem-se admitido que a variabilidade genética, principalmente a encontrada em regiões de DNAs repetitivos sejam a grande responsável pela adaptabilidade dos peixes amazônicos (Burt & Trivers, 2006).

Estudos demonstram que DNAs repetitivos, no caso elementos transponíveis, podem responder a variações no ambiente celular e externo, variações estas que podem ser avaliadas através da avaliação por estresse em organismos geneticamente controlados ou através de populações naturais da mesma espécie vivendo em condições diferentes, podendo influenciar a expressão de genes, ativando ou silenciando-os quando tais elementos são inseridos próximos ou dentro deles (Capy *et al.*, 2000).

Existem poucos estudos que relacionam sequências repetidas de DNA com mudanças ambientais na Amazônia e restringe-se ao gênero *Symphysodon* (Gross *et al.*, 2009). A utilização de elementos repetitivos no mapeamento físico cromossômico em outras espécies de peixes pode proporcionar um melhor entendimento a respeito de como estas sequências se comportam nos seus genomas e se tem alguma correlação com os diferentes ambientes em que se encontram.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Heterogeneidade ambiental na bacia amazônica

A bacia Amazônica possui a maior área de drenagem do planeta com aproximadamente 7.000.000 Km², dos quais 300.000 km² são de margens anualmente alagadas determinadas pelo regime das chuvas tropicais e pela grande extensão de terras baixas (Santos & Ferreira, 1999). Tal característica, aliada a fatores geológicos, físicos, químicos e biológicos é responsável pela grande heterogeneidade de ambientes aquáticos observados na bacia amazônica (Goulding *et al.*, 2003; Val & Almeida-Val, 1995).

Os rios amazônicos são tradicionalmente classificados de acordo com as características físico-química de suas águas. Segundo Sioli, (1984) os rios amazônicos podem ser de águas brancas, de águas claras e de águas pretas (Figura 1, Tabela 1). Os rios de águas brancas ou barrentas tem suas cabeceiras nos Andes do qual eles transportam quantidades grandes de sedimentos ricos em nutrientes, suas águas apresentam pH próximo do neutro e concentrações relativamente alta de sólidos dissolvidos. Esses rios barrentos depositam os seus sedimentos nas grandes margens das planícies de inundação, que são localmente chamadas de várzeas. As áreas de várzea possuem terras férteis e estão cobertas com comunidades altamente produtivas de planta herbáceas terrestres e aquáticas e florestas inundadas. Os principais rios de água branca são: o Amazonas, Juruá, Japurá, Purus e Madeira (Junk *et al.*, 2011).

Os rios de águas claras são caracterizados por apresentar baixas quantidades de sedimentos e sólidos dissolvidos e pH ácido variando entre 5 e 6. Nestes rios a água é transparente. As planícies inundadas de rios de águas claras são chamadas de igapós e possuem uma fertilidade intermediária. Os principais rios de água clara são: o Tapajós, Xingu e o Tocantins (Junk *et al.*, 2011).

Os rios de águas pretas são assim denominados porque suas águas apresentam uma coloração escura em tons de castanho avermelhado devido as grandes quantidades de substâncias húmicas dissolvidas. Os valores de pH variam de 4-5 (Junk *et al.*, 2011). As planícies de inundação de rios de água pretas são de baixa fertilidade. Elas estão cobertas por uma floresta inundada onde a produção de liteira é baixa, aproximadamente 30% (Furch & Junk 1997) e a taxa de crescimento das árvores quanto

ao diâmetro está até dois terços abaixo das encontradas em florestas de várzeas (Schöngart *et al.*, 2010).

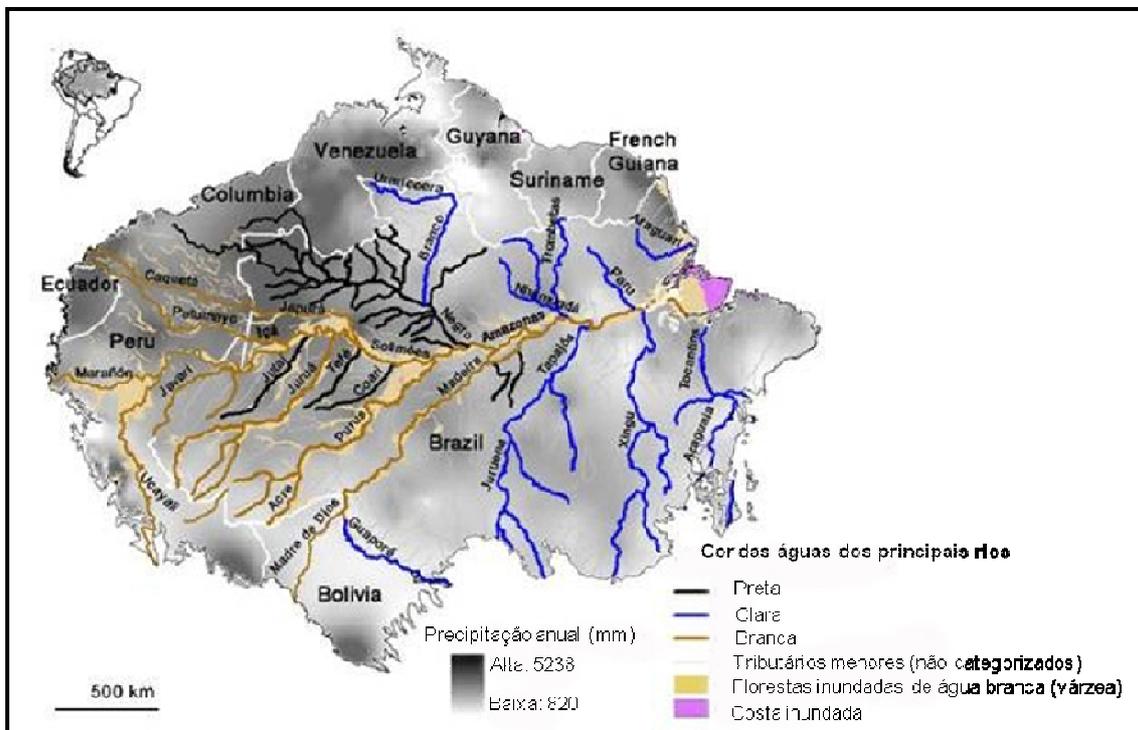


Figura 1: Mapa da Bacia Amazônica com a distribuição dos tipos de água nos principais rios: a) linhas pretas referem-se a água preta; b) linhas azuis água clara e; c) linhas marrons água branca. Fonte: Junk *et al.*, 2011.

Além dos diferentes tipos de água, a biota aquática amazônica também está adaptada ao pulso de inundação, sendo este o principal fator responsável pela existência, produtividade e interação da biota que vive nas áreas periodicamente alagadas. Este determina mudanças físico-químicas do ambiente aquático e, como consequência, as espécies respondem com uma série de adaptações morfológicas, anatômicas, fisiológicas e as comunidades respondem com alterações em sua estrutura (Junk *et al.*, 1989).

Almeida-Val & Farias (1996) sugerem que a variabilidade de ambientes amazônicos favoreceu o estabelecimento de uma grande diversidade de peixes, e que estes, desenvolveram durante o processo evolutivo uma grande plasticidade fenotípica e genotípica. A adaptabilidade dos peixes amazônicos certamente está relacionada à variabilidade genética, principalmente a encontrada em regiões de DNAs repetitivos, mais precisamente nos elementos transponíveis (Burt & Trivers, 2006).

Tabela 1: Atributos ecológicos dos rios de águas brancas, águas pretas e águas claras da Amazônia com base na classificação de Sioli (1956). Fonte: Sioli *et al.*, 2011.

Atributos ecológicos	Água branca	Água preta	Água clara
Ph	Quase neutro	Ácido, < 5	variável, 5-8
Condutividade elétrica	40-100	< 20	5-40
Transparência (disco de Secchi)	20-60cm	60-120cm	>150cm
Coloração da água	turva	marrom	esverdeada
Substâncias húmicas	baixa	alta	baixa
Suspensões inorgânicas	alta	baixa	baixa
Fertilidade do substrato e água	alta	baixa	baixa para intermediária

1.1.2 Elementos de DNA repetitivo no genoma eucarioto

Ao contrário do genoma procarionte, que possui quase que exclusivamente moléculas de DNA do tipo sequências únicas, o genoma eucarionte é muito mais complexo e apresenta sequências de DNA repetidas muitas vezes, podendo chegar até cerca de um milhão de repetições. Este componente do genoma eucarionte é chamado DNA repetitivo e pode representar, em geral, 20 a 50% do tamanho do genoma (Snustad & Simmons, 2008). Em muitas espécies tais sequências de DNA repetitivo chegam a quase totalidade do genoma, é o caso, por exemplo, da cebola (*Allium cepa*) cujo genoma é constituído em 95% de sequências repetitivas (Flavell *et al.*, 1974). Do outro lado, existem genomas caracterizados por uma baixa densidade de DNA repetitivo, é o caso do verme *Caenorhabditis elegans*, que possui 17% de sequências repetitivas (Snustad & Simmons, 2008). Cerca de metade do genoma humano é composto por sequências de DNA repetitivo (The Genome Sequencing Consortium International, 2001), e são essas sequências às vezes relatadas como responsáveis pela diferença no tamanho do genoma dos eucariotos (Cavalier-Smith, 1985; Brenner *et al.*, 1993).

O DNA repetitivo pode ser classificado como moderadamente repetitivo e altamente repetitivo. No primeiro caso, as repetições contam de 10 a 10^5 cópias por genoma, enquanto que, no segundo contam-se mais de 10^5 cópias por genoma. As sequências repetitivas podem ocorrer consecutivamente (*in tandem*), ou dispersas pelo genoma (Snustad & Simmons, 2008). Em geral, o DNA altamente repetitivo ocorre *in tandem* e concentra-se preferencialmente nas regiões do centrômero e telômero,

enquanto que, o DNA moderadamente repetitivo está disperso ao longo do cromossomo (Primrose, 2003).

Apesar de extensos estudos terem sido realizados nas últimas três décadas sobre DNA repetitivo, a forma como são propagados e mantidos no genoma ainda não foram completamente compreendidas (Martins, 2007). Mesmo assim, tem se comprovado sua importância no processo de replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e na diferenciação de cromossomos sexuais em peixes (Parise-Maltempo *et al.*, 2007), ou seja, DNAs repetitivos parecem ter um papel importante na organização estrutural e evolução de genomas (Martins, 2007).

1.1.2.1 Sequências de DNA repetitivo *in tandem*

Estas sequências são classificadas de acordo com o tamanho de seus fragmentos em três subgrupos: 1) DNA satélite, 2) minissatélites e 3) microssatélites. O DNA satélite é composto por sequências de DNA altamente repetitivo dispostas *in tandem*. São encontradas nos genomas dos eucariotos e podem variar de 1.000 a mais de 100.000 cópias no genoma, sendo que o comprimento varia de 100 a 300 pares de base (pb). Estão localizadas principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, e são o componente principal da heterocromatina (Martins, 2007). Porém, nem todas as repetições *in tandem* são restritas à heterocromatina, algumas são encontradas dispersas através do genoma, muitas vezes na região espaçadora entre genes (Primrose, 2003).

O DNA minissatélite é constituído por sequências curtas com aproximadamente 5-65 pb com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*). Podem ocorrer dispersos no genoma e agrupados nos telômeros (Charlesworth *et al.*, 1994). Através da técnica de Southern blot foi possível demonstrar que cada indivíduo apresenta um padrão particular com relação à quantidade e comprimento das cadeias de minissatélites, sendo esta técnica chamada de impressão digital de DNA (DNA *fingerprint*), que são marcadores polimórficos que podem distinguir facilmente o genoma de um organismo de outro (Jeffrey *et al.*, 1985).

O terceiro grupo das sequências repetidas *in tandem* é compreendida pelos microssatélites. Os microssatélites são constituídos por repetições curtas de 1 a 5 pb e ocorrem preferencialmente em regiões não codificantes do genoma (Toth *et al.*, 2000). São sequências altamente polimórficas apresentando extensa variação no número de

repetições, devido a isso são amplamente utilizados na genética forense para resolução de casos criminais e de paternidade. Também são aplicados em mapeamento genômico, epidemiologia molecular e conservação de espécies (Chistiakov *et al.*, 2006).

1.1.2.2 Sequências repetidas dispersas

Estas sequências também conhecidas como elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNAs repetitivos dispersos que possuem a capacidade de se transporem de um lugar para outro no cromossomo (Bowen & Jordan, 2002). Essas sequências foram descobertas pela pesquisadora Bárbara McClintock em 1940 durante seus estudos com milho, onde descreveu os “elementos controladores”. Segundo a pesquisadora esses elementos eram responsáveis por um padrão pouco comum percebido na segregação e expressão dos determinantes da coloração dos grãos (Biémont & Vieira, 2006).

Com os avanços das tecnologias de sequenciamento genômico, foi possível identificar que sequências de elementos transponíveis estão presentes na maioria dos organismos, constituindo extensa porção do genoma (Wicker *et al.* 2007). Em humanos estima-se que compreendam cerca de 45% do genoma; em ratos 40%, em milho 50%; na mosca-da-fruta e mosquito compõem 15% a 25% do genoma (Feschotte, 2004). No genoma de peixes normalmente tem se encontrado todos os tipos de elementos transponíveis conhecidos, e alguns desses elementos já foram mapeados nos cromossomos (Volf *et al.*, 2000).

A classificação dos elementos transponíveis é tradicionalmente feita de acordo com seu mecanismo de transposição. Portanto, são denominados Elementos de Classe I ou retrotransposons aqueles que transpõem através de uma cópia de RNA, enquanto que os Elementos de Classe II ou transposons transpõem através de uma cópia de DNA (Kidwell, 2002). O mecanismo de transposição dos elementos Classe I é comumente chamado de “*copy-and-paste*” (copiar-colar) enquanto que, de Classe II é chamado “*cut-and-paste*” (cortar-colar). A descoberta de elementos transponíveis que usam o mecanismo “copiar-colar”, mas sem RNA intermediário, e de pequenos TEs não autônomos chamados de MITEs (*Miniature inverted transposable element*) levou a modificação do sistema de classificação dos elementos transponíveis que passou a considerar não apenas o modo de transposição, mas também a atividade enzimática.

Com isso adotaram-se novas categorias de classificação, tais como, subclasse, superfamília e família, dentro de um contexto hierárquico (Wicker et al. 2007).

Os retrotransposons (Classe I) subdividem-se em duas subclasses que diferem quanto à presença ou ausência de repetições terminais longas (LTR) do termo em inglês *Long terminal repeats*. Exemplos de retrotransposons com LTR são: *gypsy*, *Ty3*, *Tf1* e *Ty1/copia*. Os retrotransposons sem LTR são chamados LINES (*long interspersed nuclear elements*) e SINEs (*short interspersed nuclear elements*) (Böhne et al., 2008).

O mecanismo de transposição dos retrotransposons requer ação da enzima transcriptase reversa e os RNAs transcritos são usados como molde para sintetizar DNAc, que serve como molde para síntese de um segundo DNA. O DNA resultante é transferido para outro sítio do genoma com o auxílio da enzima integrase (Evgen'ev, 2007). Uma vez que a cópia original não foi extraída e permanece na sua localização original, este processo é chamado de retrotransposição, e corresponde a um processo de duplicação. A retrotransposição é a grande responsável pelo grande número de cópias alcançado por retroelementos em muitos genomas de vertebrados (Böhne et al., 2008).

Os elementos classe II são sequências que se movimentam através de um intermediário de DNA por um mecanismo de excisão do sítio de inserção em outro sítio no genoma. Todos os elementos possuem repetições terminais invertidas (ITRs) que variam de 10 a 500 pb que flanqueiam um gene que codifica a enzima transposase (Wright & Finnegan, 2001).

A transposição desses elementos pode ocorrer de duas maneiras. No primeiro mecanismo de mobilização chamado de transposição replicativa, o elemento é duplicado obtendo-se cópias, uma cópia permanece no sítio original, enquanto a outra é inserida em um novo sítio, favorecendo o aumento do número de cópias do transposon. O segundo mecanismo é chamado de transposição não replicativa, ou seja, não ocorre a duplicação do elemento, ele se desloca diretamente de um local e se insere em um local novo sem aumentar o número de cópias.

Existem 10 famílias distintas de transposons reconhecidas atualmente: *Tc1/mariner*, *haT*, elemento *P*, *MuDR/Fokdback*, *Cacta*, *PiggyBac*, *Pif/Harbinger*, *Merlin*, *Transib* e *Banshee* (Feschotte & Prithman, 2007). Sendo os elementos mais difundidos segundo Wright & Finnegan (2001), *mariner* de *Drosophila* e elemento *Tc1* de *Caenorhabditis elegans*.

1.1.2.2.1 Elementos Transponíveis em peixes

No genoma dos peixes já foi identificada uma grande diversidade de elementos transponíveis das classes I e II (Volf *et al.*, 2003). Os estudos realizados com elementos transponíveis em peixes estão resumidos na Tabela 1.

Ozouf-Costaz *et al.* (2004) estudaram dois retrotransposons sem LTR, *Rex1* e *Rex3* em 13 espécies de peixes antárticos quanto a dinâmica do genoma e localização cromossômica e verificaram que esses elementos encontravam-se dispersos nos cromossomos, com acumulação em algumas regiões particulares, como o cromossomo sexual Y de *Chionodraco hamatus*. Capriglione *et al.* (2002) também encontraram o transposon Tc1 no cromossomo Y, isso pode indicar que os elementos transponíveis se acumulam em regiões preferenciais dos cromossomos na espécie.

Investigando a abundância e distribuição de elementos transponíveis transposons, *Tol2* e *Buffy1* e retrotransposons sem LTR *Rex3* e *Babar* em *Tetraodon nigroviridis*, Fisher *et al.* (2004) demonstraram que, tanto transposons como retrotransposons podem ser compartimentados em regiões heterocromáticas o que pode ser interpretado como uma característica de genomas pequenos e compactos como o de *T. nigroviridis*.

Espécies do gênero *Symphysodon* (acará-disco) mostraram variação na localização do retrotransposon *Rex3*, que variou de acordo com a espécie. Marcações moderadamente acentuadas foram observadas nas regiões pericentroméricas de *S. aquifasciatus*, enquanto que *S. discus* apresentou marcações bem evidentes e *S. haraldi* apresentou sinais tênues na região centromérica de alguns cromossomos. Já que cada uma das espécies de ácara-disco está relacionada a um ambiente amazônico e diferentes números de sinais conspícuos de *Rex3* foram encontrados nas espécies, os autores sugerem que tais diferenças podem estar relacionadas à adaptação dos peixes em diferentes ambientes amazônicos. Acredita-se que processos fisiológicos, incluindo expressão de genes, podem estar envolvidos com a distribuição dos elementos móveis, uma vez que os transposons e retrotransposons podem controlar genes epigeneticamente, quando inseridos nos genes ou próximos a eles (Gross *et al.*, 2009).

Mazzuchelli & Martins (2009) verificaram no ciclídeo *Astronotus ocellatus*, que os elementos transponíveis *Rex 3* e LINE, estavam agrupados nas regiões centroméricas dos cromossomos, sugerindo um padrão compartimentalizado, já que não são distribuídas aleatoriamente dentro do genoma. Essas marcações também são

coincidentes com a localização da heterocromatina reforçando a idéia de acúmulo de DNA repetitivo em regiões heterocromáticas. Esses resultados também estão de acordo com os observados por Teixeira (2008), no qual relatou que os estudos de hibridização *in situ* com os elementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, *Tc1* e *Tuc* na espécie *Cichla kelberi* que também estão localizadas na região centromérica dos cromossomos, sendo que o elemento *Rex3* também apareceu em segmentos intersticiais de alguns cromossomos. Os referidos achados sugerem que a distribuição preferencial centromérica de tais elementos repetidos devam desempenhar um papel importante na estrutura organizacional e funcional do centrômero e, conseqüentemente, do genoma destas espécies (Teixeira, 2008).

Cioffi *et al.* (2010) analisaram o elemento transponível *Rex 3* em dois cariomorfos A e D da espécie *Erythrinus erythrinus*, juntamente com DNAr 5S e 18S. Diferenças conspícuas na distribuição do DNAr 5S e do retransposon *Rex 3* foram encontradas. O *Rex 3* mostrou um padrão de distribuição intersticial e disperso ao longo dos cromossomos em ambos cariomorfos, e também na região centromérica. Todos os sítios de DNAr 5S foram co-localizados com *Rex 3*, sugerindo que estes estão associados no genoma.

Tabela 2: Elementos repetitivos dispersos e sua distribuição em espécies de peixes. Modificada de Martins, 2007. Heterocromatina (HC), Disperso (Disp), Centromérico (Cent), Telomérico (Tel)

Ordens e Espécies	Tipos de Elementos	Localização Cromossômica	Referências
Aulopiformes			
<i>Aulopus japonicus</i>		Cromossomo W	Ota <i>et al.</i> , 2003
Cypriniformes			
<i>Alburnus alburnus</i>	Gypsy, Ty3	Cromossomo B	Ziegler <i>et al.</i> , 2003
Cyprinodontiformes			
<i>Xiphophorus maculatus</i>	XIR LTR-like	Cromossomo Y	Nanda <i>et al.</i> , 2000
Perciformes			
<i>Artedidraco shackletoni</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Bovichtus angustifrons</i>	Rex1, Rex3	Disp	
<i>Chionodraco hamatus</i> ,	Tc1-like	Pericentromérica, intersticial	Tel, Capriglione <i>et al.</i> , 2002
<i>Chionodraco hamatus</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Dissostichus mawsoni</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gobius niger</i>	Mariner-like	Overlapping NORs	Mandrioli <i>et al.</i> , 2001
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gymnodraco victori</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Neopagetopsis ionah</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Notothenia coriiceps</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Oreochromis niloticus</i>	CiLINE2	Cromossomo 1 e Disp	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis niloticus</i>	Ron1	Cromossomo 1 e Disp	Bryden <i>et al.</i> , 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	Ron2	Disp	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	On2318	Cromossomo 1 e Disp	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	On239Tc1-like	Centromérica, Tel e Disp	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Patagonotothen tessellata</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus hansonii</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus newnesi</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus bernacchii</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus pennellii</i>	Rex1, Rex3	Disp	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Rex 3	pericentromérica	Gross <i>et al.</i> , 2009
<i>S. discus</i>	Rex 3	pericentromérica	Gross <i>et al.</i> , 2009
<i>S. haraldi</i>	Rex 3	Cent	Gross <i>et al.</i> , 2009
<i>Astronotus ocellatus</i>	Rex3, LINE	Cent	Mazzuchelli e Martins, 2009
<i>Cichla Kelberi</i>	Rex 1, Rex3, Rex6 e Tc1	Cent, Tel intersticial	Teixeira <i>et al.</i> , 2009
Tetraodontiformes			
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	Mariner-like	NOR-associada HC	Mandrioli e Manicardi, 2001
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Dm-Line	HC	Da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tc1-like	HC	Da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Zebulon	HC	Bouneau <i>et al.</i> , 2003
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tol2	HC	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Buffy1	4-5 cromossomos	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Rex3	HC	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Babar	HC	Fischer <i>et al.</i> , 2004
Characiformes			
<i>Erythrinus erythrinus</i>	Rex 3	Cent, Disp	Cioffi <i>et al.</i> , 2010

1.1.2.3 Famílias multigênicas

As famílias multigênicas são sequências repetidas de DNA composta por DNAs codificadores. Estas sequências são constituídas por um grupamento de genes com eminente similaridade estrutural, no que diz respeito tanto ao número quanto a organização de pares de bases, ainda que possam desempenhar funções diferentes. Essas famílias são formadas por uma cadeia de duplicações durante sua evolução, onde mutações ocorridas foram acumuladas ao longo do tempo sendo responsáveis pelas pequenas diferenças observadas entre esses genes. Uma característica comum das famílias multigênicas é que estas possuem um número considerável de pseudogenes, que demonstra uma grande semelhança com os genes funcionais da mesma família, mas que perderam sua capacidade de expressão devido a mutações adquiridas (Farah, 2007).

Um exemplo de família multigênica é a família codificadora de RNAs ribossômico. O DNA ribossômico é organizado nos eucariotos em duas famílias multigênicas distintas caracterizadas por duas classes compostas por milhares de cópias repetidas *in tandem*. A primeira classe é constituída pelo DNAr 45S que codifica os genes de RNAr 18S, 5.8S e 28S, enquanto que, a segunda é formada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S. O DNAr 5S representado por 120pb codificam sequências que são separadas uma das outras por espaçadores não transcritos (NTSs) (Wasko *et al.*, 2001; Martins & Galetti, 2001). Enquanto que, o gene RNAr 5S é altamente conservado, mesmo entre táxons não relacionados a sua NTS demonstra uma intensa variação de comprimento, o que pode dar um acentuado dinamismo para as repetições de DNAr 5S (Williams & Strobeck 1985 *apud* Martins & Wasko, 2004).

O gene de RNAr 5S nos mamíferos são geralmente localizados em apenas um par de cromossomos, e o gene RNAr 45S que corresponde a região organizadora de nucléolo encontra-se presente em vários cromossomos (Suzuki *et al.* 1996, Mäkinen *et al.* 1997 *apud* Martins & Wasko, 2004). Espécies de peixes podem apresentar os genes de RNAr 45S e 5S em vários cromossomos, além disso esses genes podem ainda assumir uma organização sintênica nos cromossomos (Pendás *et al.* 1994, Mórán *et al.* 1996) ou ainda podem ser detectados em diferentes pares de cromossomos (Martínez *et al.* 1996, Martins & Galetti 1999). A localização divergente de NOR e de DNAr 5S parece ser a situação mais comumente encontrada em peixes (Lucchini *et al.* 1993, Suzuki *et al.* 1996).

A localização cromossômica dos genes de RNAr foi descrita em 67 espécies de peixes que representam grupos distintos, como Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes e Tetraodontiformes. Os dados prévios mostraram que o local dos genes de rRNA 5S corresponde a uma posição intersticial nos cromossomos de quase todas as espécies analisadas. Como tal localização também já foi encontrada em mamíferos e anfíbios acredita-se que tal padrão não seja casual, e que essa distribuição poderia representar alguma vantagem relacionada à organização destes genes no genoma dos vertebrados (Martins & Wasko, 2004), protegendo estes seguimentos de eventos evolutivos como, a transposição, por exemplo, que poderiam atuar na dispersão de sequências que estão localizadas em posição terminal dos cromossomos (Galetti & Martins, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que sequências repetitivas podem estar relacionadas a uma série de questões adaptativas ao organismo. Como por exemplo, conferindo uma adaptação térmica a vários organismos, dentre eles os peixes (Varriale *et al.*, 2008). Ainda, estão envolvidos na evolução do sistema imune dos vertebrados (Burt & Trivers, 2006). De acordo com Capy *et al.* (2000) elementos transponíveis podem responder a variações no ambiente celular e externo. Essas variações podem ser avaliadas através da aplicação de estresse em organismos geneticamente controlados ou através da análise de populações naturais da mesma espécie vivendo em diferentes condições, podem influenciar a expressão de genes, ativando ou silenciando-os quando inseridos próximos ou dentro deles (Capy *et al.*, 2000).

Existem poucos estudos relacionando elementos transponíveis com mudanças ambientais. Um exemplo desse tipo de caso foi relatado em *Drosophila*, onde o número de cópias do elemento 412 aumenta com a latitude seguindo a diminuição da temperatura (Vieira & Biémont, 1996). Em peixes amazônicos restringe-se ao gênero *Symphysodon*, onde tais sequências repetitivas também parecem atuar na adaptação a diferentes biótopos e na geração da variabilidade fenotípica e genética (Gross *et al.*, 2009). Diante disso, a utilização de elementos repetitivos no mapeamento físico cromossômico na espécie *Hoplias malabaricus* pode proporcionar o entendimento de como estas sequências se comportam no seu genoma e se tem alguma correlação com os diferentes ambientes em que se encontram.

1.1.3 Aspectos biológicos e citogenéticos de *Hoplias malabaricus*

A espécie *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) também conhecida como traíra, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo na maioria das bacias hidrográficas da América do Sul (Bertollo *et al.*, 2000). Morfologicamente é caracterizada por apresentar o corpo cilíndrico, chegando a atingir 50 cm de comprimento total com coloração cinza-escuro a amarronzada com manchas corporais irregulares (Figura 2). A cabeça é robusta com placas ósseas, os dentes são cônicos e caniniformes de diversos tamanhos em ambas as maxilas. Além disso, suas nadadeiras possuem faixas formadas por pequenas manchas escuras e claras, alternadamente. A nadadeira caudal é arredondada e a dorsal apresenta de 13 a 15 raios (Santos *et al.*, 2006).

Uma característica distintiva de *H. malabaricus* em relação a outras espécies do gênero *Hoplias* é que a sua linha dentária converge na forma de “V” com o vértice apontando para a sínfise mandibular, enquanto que nas outras, estas linhas são aproximadamente paralelas e não se encontram na região sinfisiana como observado em *H. curupira* (Oyakawa & Mattox 2009) (Figura 3).



Figura 2: Exemplo de *Hoplias malabaricus*

As traíras têm o hábito alimentar carnívoro e nas fases juvenis é insetívora (Vasconcellos, 2003), mas esta espécie é considerada oportunista, pois mudanças na sua dieta decorrente da oferta de alimento e da competição já foram detectadas, mostrando que *Hoplias malabaricus* se alimenta dos recursos disponíveis no ambiente mostrando sua adaptação a ambientes efêmeros (Carvalho *et al.*, 2002).

Trata-se de uma espécie sedentária encontrada em ambientes lacustres e fluviais, principalmente lagos, açudes, matas inundadas, córregos e igarapés, pois tem preferência por ambientes de águas lânticas, com baixa profundidade e com vegetação

(Sabino & Zuanon, 1998; Vicari e Bertollo, 2001). Sua reprodução ocorre principalmente no período chuvoso com desova parcelada e apresentam cuidado parental, no qual o macho cuida do ninho reagindo a presença de qualquer possível predador (Marques *et al.*, 2001; Querol *et al.*, 2003; Brito, 2003).

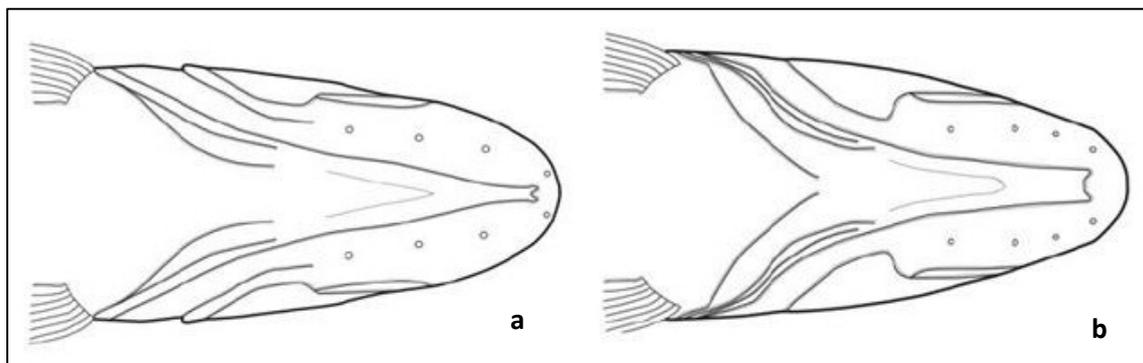


Figura 3: Vista ventral da cabeça de *H. malabaricus* (a) e de *H. curupira* (b). Fonte: Oyakawa e Mattox (2009)

Os estudos no gênero *Hoplias* iniciaram-se na década de 70 com Bertollo *et al.* (1978), analisando a espécie *Hoplias lacerdae*. A partir daí vários estudos têm sido realizados nesse gênero a fim de esclarecer as diversas razões que levaram a grande diversificação genética desse grupo de peixes.

Dentro do gênero a espécie mais estudada é *Hoplias malabaricus*, que ao longo de sua distribuição apresenta variações no número diplóide de $2n=39$ a $2n=42$, na morfologia cromossômica, presença ou não de sistemas de cromossomos sexuais e número de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Tabela 2) (Bertollo *et al.*, 2000; Vicari *et al.*, 2005). Devido a grande diversidade cariotípica encontrada nesta espécie Bertollo *et al.* (2000) caracterizou sete citótipos distintos que foram separados em dois grandes grupos: Grupo I (citótipos A, B, C, D) e grupo II (citótipos E, F, G).

A ocorrência desses citótipos segundo Prioli *et al.* (2000), poderia ser resultado pelo menos em parte do hábito sedentário das traíras e do fato desta não ser uma espécie migratória, ocasionando a formação de populações locais ou subpopulações, com pouca conexão e conseqüentemente pouco fluxo gênico decorrente de isolamento-por-distância.

É certo da existência de citótipos simpátricos dentro de *H. malabaricus*, sendo encontrada em várias populações descritas ao longo do território brasileiro e da Argentina. É o caso, por exemplo, das populações do Igarapé Mindu em Manaus (AM)

(citótipos A e C), no rio Aguapey, Corrientes/Argentina (citótipos A e C) (Bertollo *et al.*, 1997a, 2000; Lopes *et al.*, 1998), na planície de inundação do Alto rio Paraná (citótipos A, C e D) (Pazza & Júlio, 2003), no Parque Estadual do rio Doce em Minas Gerais (Citótipos A e B) (Born & Bertollo, 2006), na Bacia do rio Tibagi-Paraná (Citótipo A e C) (Rosa, 2006) e no igarapé do Urumari em Santarém (PA) (citótipos A, C e G) (Tabela 2) (Lima, 2006). Em todos os estudos já realizados que demonstraram citótipos ocorrendo em simpatria, não foi observado nenhum caso de híbridos, fato este que, evidencia um possível isolamento reprodutivo entre indivíduos de citótipos diferentes.

Os estudos por bandeamento C realizados em *Hoplias malabaricus* demonstraram que a região heterocromática coincide principalmente com as regiões centroméricas dos cromossomos (Bertollo *et al.*, 1997b; Vicari *et al.*, 2005; Rosa, 2006), mas também, já foram verificados em regiões pericentroméricas e teloméricas (Dergam & Bertollo, 1990; Born & Bertollo, 2000; 2001).

As traíras apresentam variação no número de NOR, podendo ser múltiplas, que variam de três a sete marcações sempre nas regiões teloméricas dos cromossomos (Bertollo *et al.*, 1997; Rosa, 2006; Lima, 2008; Santos *et al.*, 2009; Cioffi *et al.*, 2009; 2010; Marques, 2011), podendo ser também biteloméricas (marcações nos dois telômeros), sendo esta última uma característica comum para *H. malabaricus* (Bertollo, 1996; Born & Bertollo, 2000; 2001; Vicari *et al.*, 2005). NOR intersticial é uma ocorrência incomum nesse grupo de peixes, mas também já foi detectada (Born & Bertollo, 2000; 2001). Diferenças na atividade do gene podem ser relacionadas a variações intrapopulacionais no número de Ag-NOR, como foi verificado no citótipo B do Parque Estadual do Rio Doce (Born & Bertollo, 2000).

Fluorocromos GC específicos também são úteis para identificar os mesmos locais da NOR detectados por Nitrato de prata, embora em muitos casos com menos intensidade (Born & Bertollo, 2000). Hibridização com sondas de DNAr ou RNAr também tem confirmado a localização das NOR independente de atividade (Cortinhas *et al.*, 2003). Uma dessas sondas é a DNAr 18 S que são utilizadas para inferir a filogenia entre as espécies (Rosa, 2006). Born & Bertollo (2000) usando sondas de DNAr 18S em *Hoplias malabaricus* detectaram a presença de 10 cromossomos portando marcações, três a mais que o observado pelo nitrato de prata. Já os cistrons de DNAr 5S foram localizados intersticialmente em um único par de cromossomo e independente dos sítios de 18S.

Martins *et al.* (2006) analisaram uma família de DNA repetitivo em *tandem* denominada de 5S*HindIII*-DNA, o qual apresentou semelhança com as sequências do DNAr 5S e seus espaçadores no genoma de *Hoplias malabaricus*. A hibridização da sequência de 5S *HindIII*-DNA evidenciaram nove pares de cromossomos marcados na região centromérica, enquanto que a sonda de DNAr 5S marcaram dois pares de cromossomos na posição intersticial dos cromossomos. Segundo o mesmo autor, essa localização da família de DNA satélite 5S *HindIII*-DNA no centrômero seria explicado devido o seu possível envolvimento, no que se refere à estrutura ou à função da organização do centrômero.

Um estudo comparativo foi realizado utilizando as sequências repetitivas de DNAr 5S e 5S*HindIII* em *Hoplias malabaricus* (Citótipos A, D e F), *H. lacerdae*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Erythrinus erythrinus* o qual revelaram diferenças quanto ao número e posição dos sítios de DNAr 5S e 5S*HindIII* entre estas espécies. O DNAr 5S no citótipo A apresentou dois pares marcados intersticialmente, enquanto que no citótipo D e F ambos apresentaram um par de cromossomos marcados na posição intersticial e pericentromérica respectivamente. Quanto ao DNA satélite 5S *HindIII* foi verificado apenas em *Hoplias malabaricus* não sendo encontrada para as outras espécies de Erythrinidae, sendo portanto exclusiva desta espécie (Ferreira *et al.*, 2007). As diferenças encontradas entre os citótipos foram de 18 cromossomos marcados no citótipo A, 22 no D e 20 no F (Ferreira *et al.*, 2007; Cioffi *et al.*, 2009).

Devido *H. malabaricus* ser amplamente distribuída em todos os sistemas hidrográficos da América do Sul, a origem destas sequências parece ter ocorrido antes da divergência e da dispersão dos cariomorfos de *H. malabaricus*, sugerindo que as sequências de 5S*HindIII* têm acompanhado as alterações cromossômicas que levaram à alta diversidade de cariótipos encontradas na espécie (Ferreira *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2010).

Tabela 3: Citótipos de *Hoplias malabaricus*. Fonte: Bertollo *et al.*, 2000.

Citótipo	Número diplóide	Sistema sexual	Localização
A	2n=42	Indeterminado	Norte ao Sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina
B	2n=42	XX/XY	Sistema de lagos do Vale do Rio Doce-MG
C	2n=40	Indeterminado	Norte do Brasil e nordeste da Argentina
D	Macho: 2n=39 Fêmea: 2n=40	Machos: X ₁ X ₂ Y Fêmeas: X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	Norte do Paraná
E	2n=42	Indeterminado	Rio Trombetas-PA
F	2n=40	Indeterminado	Suriname ao sudoeste do Brasil, preferencialmente na parte oriental do continente
G	Macho: 2n=40 Fêmea: 2n=41	Fêmeas: XX Machos: XY ₁ Y ₂	Restrito a alguns locais na Amazônia

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar possíveis variações cariotípicas relacionadas com a mobilização intragenômica de sequências de DNA repetitivo em *Hoplias malabaricus* proveniente de distintos ambientes aquáticos da bacia amazônica.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar possíveis relações da estrutura citogenômica de *Hoplias malabaricus* com processos adaptativos a diferentes ambientes aquáticos da bacia amazônica;
- Localizar e descrever as regiões de heterocromatina constitutiva no cariótipo;
- Localizar e caracterizar as regiões organizadoras de nucléolo (NORs);
- Identificar sítios cromossômicos ricos em pares de bases GC;
- Mapear a localização cromossômica dos genes DNAr5S e 18S;
- Mapear a localização cromossômica de sequências do elemento transponível *Rex 3*;
- Analisar comparativamente os cariótipos de *Hoplias malabaricus* em amostras provenientes de ambientes de água branca, água clara e água preta da bacia amazônica;

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIAS, I. P. Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Val, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (eds). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996 p. 257-271.

BARTHEM, R. B. Biodiversidade e funções ecológicas dos ecossistemas: Componentes biota aquática. In: CAPOBIANCO, J. P. R. *et al.*, (org). **Biodiversidade na Amazônia Brasileira**. Instituto Socioambiental. São Paulo: Estação Liberdade, 2001 p. 60-78.

BERTOLLO, L. A. C. The nucleolar organizer regions of Erythrinidae fish. An uncommon situation in the genus *Hoplias*. **Cytologia**, v. 61, p. 75–81, 1996.

BERTOLLO, L. A. C. *et al.* A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p. 603-613, 2000.

BERTOLLO, L. A. C. *et al.* 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, 1997b.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M. S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytotypes with $2n=40$ chromosomes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 237-342, 1997a.

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

BIÉMONT, C. & VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.

BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 596-600, 1999.

BLANCO, D. R. *et al.* Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 1- 8, 2010.

BOHNE, A. *et al.* Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v. 16, p. 203-215, 2008.

BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. 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, 2000.

BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with 2n=42 chromosomes. **Genetica**, v. 110, p. 1-9, 2001.

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

BOWEN, N. J. & JORDAN I. K. Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity. **Molecular Biology**, v. 4, p. 65-76, 2002.

BRENNER *et al.* Characterization of pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. **Nature**, v. 366, p. 265-268, 1993

BRITO, S. G. C. **Peixes do Rio Paranapanema**. São Paulo: Horizonte Geográfico, 2003, 48p.

BURT, A. & TRIVERS, R. Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Cambridge: Harvard University Press, 2006. p. 228-300.

CAPRIGLIONE, T. *et al.* Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. **Gene**, v. 295, p. 193-198, 2002.

CAPY, P. *et al.* Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity**, v. 85, p. 101-106, 2000.

CARVALHO, L. N.; FERNANDES, C. H. V.; MOREIRA, V. S. S. Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense. **Revista Brasileira Zoociências**, Juiz de Fora, v. 4, n. 2, p. 227-236, 2002.

CAVALIER-SMITH, T. 1985; Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. **Journal Cell Science**, v. 34, p. 247-278, 1978.

CIOFFI, M. B. & BERTOLLO, L. A. C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity**, p. 1 – 8, 2010.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative Chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, v. 10, n. 34, p. 1-11, 2009.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **Evolutionary Biology**, v. 10, n. 271, 2010.

CHARLESWORTH, B.; SNEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

CHISTIYAKOV, A. D.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, A. M. F. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1-29, 2006.

CORTINHAS, M. C. S. *et al.* First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, C-NOR and CMA3 bandings and FISH studies. **Caryologia**, v. 56, n. 2, p. 187 -191, 2003.

DERGAM, J. A. & BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 13, p. 755-766, 1990.

EVGEN'EV, M. B. Mobile Elements and Genome Evolution. **Molecular Biology**, v. 41, n. 2, p. 203-213, 2007.

FARAH, S. B. Decifrando o genoma humano. In: **DNA Segredos e Mistérios**, p.155-202, 2007.

FERREIRA, I. A.; Bertollo, L. A. C.; Martins, C. Comparative chromosome mapping of 5SrDNA and 5S *Hin* dIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 118, p. 78-83, 2007.

FESCHOTTE C. Merlin, a New Superfamily of DNA Transposons Identified in Diverse Animal Genomes and Related to Bacterial IS1016 Insertion Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 9, p. 1769-1780, 2004.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368, 2007.

FISHER, C. *et al.* Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**, v. 336, p. 175-184, 2004.

FLAVELL, R. B. *et al.* Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical Genetics**, v.12, p. 257-269, 1974.

FURCH, K.; JUNK, W. J. Physicochemical conditions in floodplains. In: JUNK, W. J. (ed) **The Central Amazon floodplain: ecology of a pulsing system. ecological studies**. Berlin: Springer Verlag, vol 126. 1997. p. 69–108.

GALETTI JR, P. M. & MARTINS, C. Contribuição da Hibridização *in situ* para o Conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra, M. (ed). **FISH: Conceitos e aplicações na Citogenética**. Ribeirão preto: editora Sociedade Brasileira de Genética, 2004, p. 61-88.

GOULDING, M.; BARTHEM, R. B.; FERREIRA, E. J. G. The Negro and the Trombetas –black and clear waters from ancient lands. In: **The Smithsonian Atlas of the Amazon**. Hong Kong: Princeton Editorial Associates, Inc. 2003. p. 211-226.

GROSS, M. C. *et al.* Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. **Cytogenet Genome Research**, p. 1-11, 2009.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**. v. 314, p. 67-74, 1985.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE. D. P (ed). **Proceedings of the International Large River Symposium**. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 1989.106p.

JUNK, W. J. *et al.* A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. **Wetlands**, v. 1, p. 623-640. 2011.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. v. 115, p. 49-63, 2002.

LI, Y.C. *et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2453-2465, 2002.

LIU, Z. *et al.* Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemistry Biophysical Research Communications** v. 289, p. 317-324, 2001.

LIMA, M. P. **Citogenética evolutiva de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Erythrinidae, characiformes): análise cariotípica de espécimes provenientes do igarapé urumari, Santarém-Pa.** 2006. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará, Santarém.

LOPES, P. A. *et al.* A Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey River (Province of Corrientes, Argentina). **Copeia**, v. 2, p. 485-487, 1998.

LUCCHINI S, *et al.* Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v. 36, p. 762-773, 1993.

MARQUES, D. F. 2010. **Diversidade cromossômica e molecular (DNA Barcode) no complexo *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) da região do baixo Amazonas.** 2010, 71f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia). Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém.

MARQUES, D. K. S.; GURGEL, H. C. B.; LUCENA, I. Época de Reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1974 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira Zoociências**, Juiz de Fora, v. 3, n. 1, p. 61-67, 2001.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E. *et al.* (eds). **Fish Cytogenetics**. Science Publisher, Inc., USA. 2007.

MARTINS, C. *et al.* A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, p. 133–141, 2006.

MARTINS, C. & GALETTI JR, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363–367, 1999.

MARTINS, C. & GALETTI JR., P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? **Genetica**, v. 111, p. 439-446, 2001.

MARTINS, C. & WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: **Focus on Genome Research** (Ed. CR Williams) Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA. p.335-363, 2004.

MARTINEZ, J. L. *et al.* Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla Anguilla*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 73, p. 149-152, 1996.

MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, v. 136, p. 461-469, 2009.

MÓRAN, P. *et al.* Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetics and Cell Genetics** v. 75, p. 145-150, 1996.

OZOUF-COSTAZ, C. *et al.* Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposon *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, n.1, p. 51-57, 2004.

OYAKAWA, O. T. & MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 2, p. 117-140, 2009.

PARISE-MALTEMPI, P. P. *et al.* Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetics and Genome Research**, v.116, n. 3, p. 218-223, 2007.

PAZZA, R.; JÚLIO JR, H. F. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the Upper Paraná River. **Cytologia**, v. 68, p.159-163, 2003.

PENDÁS, A. M. *et al.* Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 31-36, 1994.

PRIMROSE, S. B. **Princípios de Análise do Genoma**. Editora FUNPEC, Ribeirão Preto, SP, 2ª Edição, 196p., 2003.

PRIOLI, A. J.; RENESTO E.; JULIO JR, H. F. Variabilidade e Estrutura Genética de Populações Naturais: Polimorfismo Molecular em Populações de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Relatório Técnico do Programa PELD/CNPq. 2000.

QUEROL, M. V. M. *et al.* Reprodução induzida de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), em tanques experimentais, na Região de Uruguaiiana, Pampa Brasileiro. **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguaiiana, v. 1, n. 1, p. 46-57, 2003.

ROSA, R. da. **Estudos Citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)**. 2006. 102f. Dissertação (mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto Agrônomo do Paraná, Universidade federal de Londrina, Londrina.

SABINO, J.; ZUANON, J. A stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 8, p. 201-210, 1998;

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G. Peixes da Bacia Amazônica. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999. p. 345-373.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, 2006. 144p.

SANTOS, U. *et al.*. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**. v. 75, p. 2326- 2343, 2009.

SCHÖNGART, J.; WITTMANN, F.; WORBES, M. Biomass and net primary production of Central Amazonian floodplain forests. In: JUNK, W. J. *et al.* **Amazonian floodplain forests: ecophysiology, biodiversity and sustainable management**. Berlin: Springer Verlag, 2010. p 347–388.

SIOLI, H. The Amazon and its main effluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli, H. (ed). **The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. Netherlands, W. Junk Publications, 1984. p. 127-166.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 903p.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 72, p. 1-4, 1996.

TEIXEIRA, W. G. **Identificação e Caracterização de Sequências Repetidas de DNA no genoma de peixes ciclídeos do gênero CICHLA**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, UNESP, São Paulo.

THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v. 409, p. 860-921, 2001.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatélites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**. v. 10, p.967-981, 2000.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features**. Heidelberg: Springer Verlag. 1995. 224p.

VARRIALE, A.; TORELLI, G.; BERNARDI, G. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. **RNA**, v. 14, p. 1492-1500, 2008.

VASCONCELLOS, M. G. **Características Reprodutivas de Três Espécies de Erythrinidae (Pisces: Characiformes) da Bacia do São Francisco, submetidas à Hipofixação**. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology** [in press], 2005.

VICARI, M. R.. & BERTOLLO, L. A. C. Citogenética comparativa de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Estudos em região divisora de águas para as bacias dos rios Tibagi, Iguaçu, Ivaí e Ribeira (Ponta Grossa, PR). I. dados preliminares. PPGGEv/UFSCAR. 2001.

VIERA, C. & BIÉMONT, C. Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. **Journal Molecular Evolution**, v. 42, p. 443-451, 1996.

VOLFF, J. N.; KORTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular and Biology Evolution**, v. 17, p. 1673-1684, 2000.

VOLFF, J. N. *et al.* Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 12, p. 674-678, 2003.

WASKO, A. P. *et al.* Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genoma**, v. 44, p. 893-902, 2001.

WICKER, T. *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*. v. 8, p. 973–982, 2007.

WRIGHT, S. & FINNEGAN, D. Genome evolution: Sex and the transposable element. **Current Biology**, v. 11, n. 8, p. 296-299, 2001.

CAPÍTULO I

VARIAÇÃO CITOGENÔMICA EM *HOPLIAS MALABARICUS*, CARIOMORFO C, DE RIOS DE ÁGUA BRANCA, ÁGUA CLARA E ÁGUA PRETA DA BACIA AMAZÔNICA¹

Santos, F. A., et al.

1 - O artigo será submetido à revista *Journal of Fish Biology* (ISSN 0022-1112)

RESUMO

A bacia amazônica possui uma grande diversidade de espécies de peixes que ocorrem em diferentes tipos de ambientes aquáticos. Entre os vários fatores que distinguem tais ambientes amazônicos podemos destacar a coloração das águas dos rios, que permitem classificá-los em rios de águas brancas, águas claras e águas pretas. No presente estudo analisamos espécimes de *Hoplias malabaricus* coletados nos diferentes tipos de rios amazônicos com o objetivo de identificar variação citogenômica entre as amostras, que possivelmente estejam relacionadas com processos adaptativos locais. Os cariótipos foram analisados por marcadores clássicos (coloração convencional, bandeamento C e NOR) e moleculares (coloração com CMA3, FISH com sondas DNAr 5S, 18S e retroelemento *Rex 3*). Foram analisados 60 indivíduos coletados no Rio Amazonas (água branca), no Rio Negro (água preta) e no Rio Tapajós (água Clara). Todos os espécimes apresentaram número diplóide de $2n=40$ cromossomos e fórmula cariotípica de $20M+20SM$ para ambos os sexos. As três amostras apresentaram pequenas variações da estrutura citogenômica observadas no padrão de bandas heterocromáticas, assim como no número de sítios e localização dos marcadores CMA3, NOR, DNAr 5S, DNAr18S e *Rex 3*. Os resultados evidenciaram a mobilização intragenômica de elementos repetitivos no genoma de *Hoplias malabaricus*, que podem ser associados a estratégias de adaptação local a diferentes tipos de ambientes aquáticos na bacia amazônica.

Palavras-chave: DNA repetitivo, FISH, *Hoplias malabaricus*, retrotransposon

INTRODUÇÃO

A bacia amazônica é o maior sistema de drenagem de água doce do mundo e cobre uma área que compreende cerca de um terço da América do Sul. Esta região possui uma enorme diversidade de peixes e de habitats aquáticos (Goulding, 1997; Barthem, 2001). Tradicionalmente, os rios amazônicos podem ser classificados de acordo com a coloração de suas águas em rios de águas brancas, claras e pretas (Sioli, 1984). Tal variação é resultado de aspectos geomorfológicos e físico-químicos do ambiente, que uma vez estabelecidos podem exercer sobre a biota aquática desafios ecológicos que implicam no desenvolvimento de processos adaptativos, os quais podem se refletir em mudanças morfológicas, fisiológicas, comportamentais e até mesmo genéticas (Junk *et al.*, 1989).

A plasticidade genômica e o comportamento evolutivo de elementos de DNA repetitivo parecem ter um papel importante em processos adaptativos (Burt & Trivers, 2006). O DNA repetitivo inclui sequências satélites dispostas *in tandem*, minissatélites e microssatélites, além de arranjos repetidos dispersos tais como os transposons e retrotransposons. São também consideradas DNA repetitivo as famílias multigênicas, que ocorrem em repetições de centenas e milhares de cópias, tais como as famílias que codificam RNA ribossomal (Martins, 2007).

Os peixes representam o grupo basal de vertebrados e seu genoma retém todos os tipos de DNA repetitivo, incluindo os elementos transponíveis (Volff *et al.*, 2000; Martins, 2007). A mobilidade intragenômica de elementos transponíveis é considerada um dos mecanismos que promove a origem da variabilidade genética, que permite a seleção atuar em resposta a mudanças ambientais (Capy *et al.*, 2000). De fato, tem se demonstrado, em vários organismos, que a mobilidade de elementos transponíveis pode ser induzida em resposta a estímulos externos (estresses), embora esta relação não possa ser generalizada para todos os elementos e populações (Capy *et al.*, 2000).

Uma das maneiras de se testar a hipótese de que a atividade de elementos transponíveis pode ser induzida por fatores ambientais é analisar populações naturais da mesma espécie submetidas a diferentes condições. A família de retroelementos Rex é abundante em teleósteos e exibe variado padrão de organização genômica (Volff *et al.*, 2001), podendo assim, constituir um bom marcador para análise do efeito da heterogeneidade ambiental sobre o genoma de peixes amazônicos. Gross *et al.* (2009)

demonstraram um padrão variável de localização genômica do *Rex 3* entre espécies de acará-disco (*Symphysodon*) acompanhado por variação fenotípica e ambiental. Entretanto, o papel dos elementos repetitivos na adaptação deste organismo a diversos habitat da bacia amazônica permanece ainda pouco esclarecido.

No presente trabalho foram analisados diferentes marcadores de DNA repetitivo em *Hoplias malabaricus* coletados em ambientes de água branca, água clara e água preta da bacia amazônica, a fim de se testar a hipótese de que pequenas variações da organização genômica podem ocorrer entre populações da mesma espécie expostas a diferentes condições ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas e preparação cromossômica

Foram analisados 60 espécimes de *Hoplias malabaricus*, dos quais 20 foram coletados no Rio Amazonas, nas proximidades de Santarém e Almeirim, no estado do Pará; 20 no Rio Tapajós nas proximidades de Santarém e Miritituba, no estado do Pará; e por fim 20 exemplares foram coletados no Rio Negro, nas proximidades de Manaus, estado do Amazonas. O ambiente de água branca é representado pelo Rio Amazonas, o de água clara pelo Rio Tapajós e o de água preta pelo Rio Negro.

A identificação taxonômica foi baseada em caracteres externos descritos por Oyakawa & Mattox (2009). As coletas foram autorizadas pelo IBAMA/SISBIO (Nº 24384-1) e os espécimes testemunho encontram-se depositados na Coleção Ictiológica da UFOPA e Coleção de Peixes do INPA. Como *Hoplias malabaricus* compreende um complexo de espécies que inclui sete cariomorfos claramente distintos com base na macroestrutura do cariótipo (Bertollo *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009) limitamos a amostragem a espécimes com o mesmo número diplóide ($2n=40$) e fórmula cariotípica (20M+20SM) na tentativa de garantir que as amostras são representativas da mesma espécie.

As preparações cromossômicas foram realizadas após a estimulação de mitoses com o uso de fermento biológico (Bertollo, 1986), seguida pela extração do rim cefálico pré-tratado com colchicina 0.0025% (Bertollo *et al.*, 1978). Todos os peixes foram previamente sedados e sofreram eutanásia com o uso de eugenol.

Marcadores clássicos, bandeamentos e fluorocromo.

Pelo menos 30 metáfases de cada espécime foram analisadas para a determinação do número diplóide modal e da fórmula cariotípica. Regiões heterocromáticas, que normalmente são ricas em DNA satélite, foram evidenciadas pelo bandeamento C (Sumner, 1972). Regiões organizadoras de nucléolo, ricas em repetições do cistron DNAr 45S, foram evidenciadas pela impregnação do nitrato de prata (Howell & Black, 1980). A identificação de sítios ricos em pares de base GC foi realizada com a marcação pelo fluorocromo cromomicina A3 (CMA3) contra corado com verde metil (Schweizer, 1976; Donlon e Magenis, 1983).

PCR e Hibridização in situ

Sondas dos elementos repetitivos DNAr 5S, 18S e retrotransposon *Rex 3* foram obtidas via PCR usando-se os primers já descritos na literatura (Volff *et al.*, 1999, 2000, 2001; Komiya & Takemura, 1979; Cioffi *et al.*, 2009). As reações de PCR tiveram um volume total de 15 µl, com a seguinte composição: 1 µl de DNA genômico; 1,5 µl de tampão 10X; 2,4 µl de DNTPs (1,25mM); 0,6 µl de MgCl₂ (50mM); 0,6 µl de cada *primer* (5mM); 0,12 µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl) e 8,18 µl de água ultrapura. Os perfis das reações foram: DNAr 5S – desnaturação inicial (94° C/1 min.), [desnaturação (94° C/1 min.), adaptação dos primers (57° C/1 min.), extensão (72° C/1 min. e 30 seg.) repetidos por 30 ciclos], extensão final (72° C/5 min.); DNAr 18S – desnaturação inicial (95° C/1 min.), [desnaturação (94° C/1 min.), adaptação dos primers (56° C/1 min.), extensão (72° C/1min. e 30 seg.) repetidos por 35 ciclos], extensão final (72° /5 min.); *Rex 3* – desnaturação inicial (95° C/2 min.), [desnaturação (95° C/1 min.), adaptação dos primers (55° C/40 seg.), extensão (72° C/2 min.) repetidos por 35 ciclos], extensão final (72° C/5 min.).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium-Uniscience) e nas reações positivas, foram marcados com biotina-14-dATP por *nick translation* usando-se o kit Bionick Labeling System (Invitrogen) seguindo-se as instruções do fabricante.

As reações de hibridização *in situ* foram realizadas de acordo com Pinkel *et al.* (1986). Os sinais de hibridização foram detectados e amplificados usando Avidina-FITC e anti-avidina-FITC. Os cromossomos foram contracorados com DAPI e as melhores metáfases foram fotografadas digitalmente com auxílio do programa Image-Pro MC 6.0 usando-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX51 dotado de

câmera DP70. A montagem dos cariótipos e ajustes de brilho e contraste foi efetuada com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.

RESULTADOS

Todos os espécimes apresentaram cariótipo com $2n=40$ cromossomos, sendo 20 metacêntricos e 20 submetacêntricos (Figura 1). Não foi detectada variação cariotípica entre machos e fêmeas.

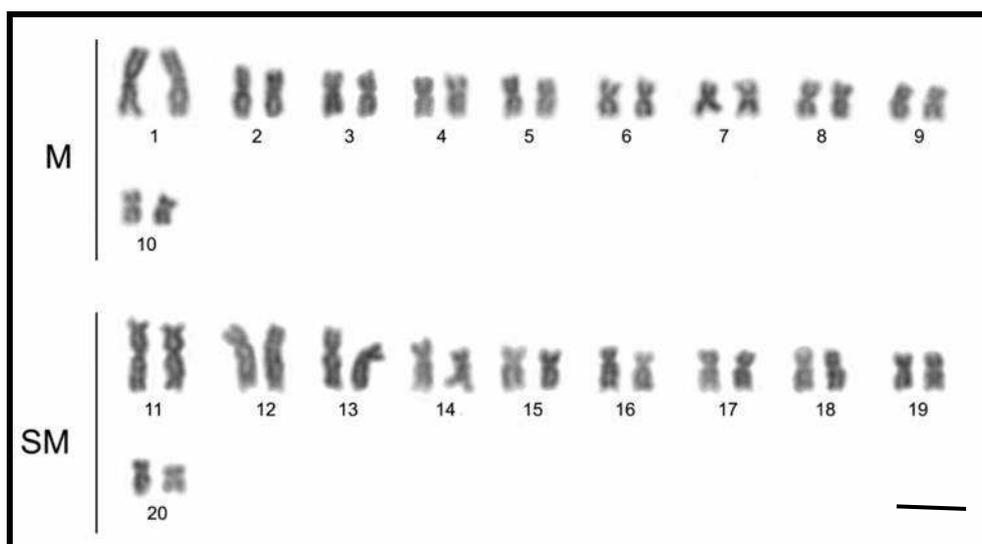


Figura 1: Cariótipo de *Hoplias malabaricus* ($2n=40$) proveniente da bacia amazônica em coloração convencional. Barra=10 μ m.

Embora a macroestrutura do cariótipo tenha sido conservada entre as três populações, o mesmo não ocorreu com a distribuição dos elementos repetitivos. O número de cromossomos portadores de sítios Ag-NOR foi conservado nas três populações, que mostraram quatro cromossomos marcadores. Entretanto, nas amostras oriundas de água preta um dos pares marcados apresentou NOR bitelomérica (Figura 2a, b, c). Todas as marcações foram localizadas na região telomérica.

Os padrões de distribuição de sítios ricos em pares de base GC foram claramente distintos entre amostras dos três ambientes, variando de três a seis sítios (Figura 2d, e, f). Todos os sítios ricos em GC foram localizados em regiões centroméricas, exceto um sítio distal localizado em amostra do ambiente de água branca (Figura 2d).

O número de sítios DNAr 18S variaram de três a seis (Figura 2g, h, i). Em amostras dos ambientes de água branca e clara foram detectados seis sítios, enquanto que, nas de água preta apenas três sítios. Nas três populações um conspícuo sinal do

sítio DNAr 18S foi evidenciado na região centromérica de um par submetacêntrico. A presença de NOR bitelomérica no cariótipo representativo do ambiente de água preta não foi confirmada por FISH do DNAr 18S. Portanto, houve uma clara discrepância entre os padrões de distribuição de sítios repetitivos DNAr 18S revelados por marcação Ag-NOR e FISH.

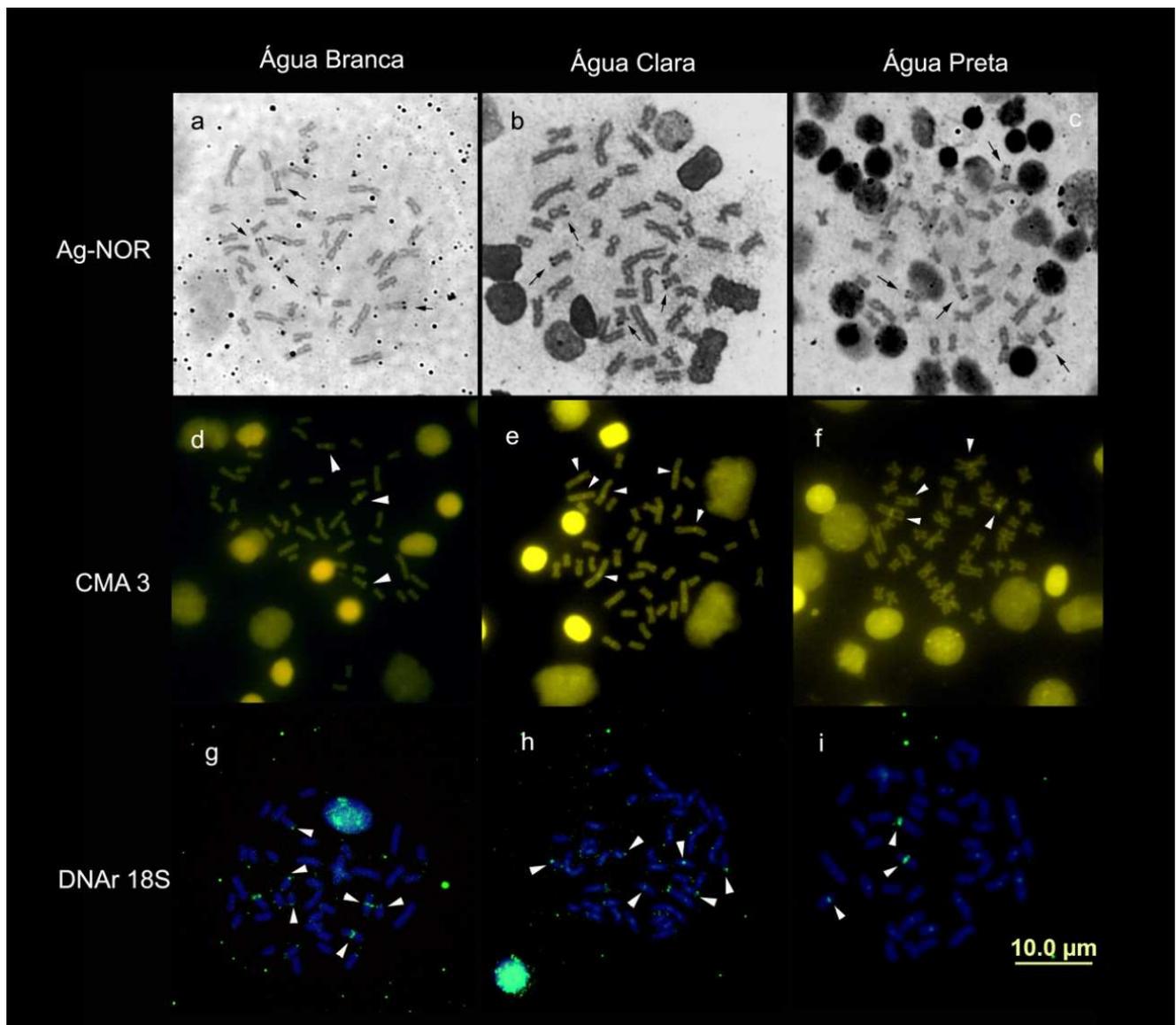


Figura 2: Metáfases de *Hoplias malabaricus* ($2n=40$) provenientes de ambientes de água branca, água clara e água preta da bacia amazônica, submetidas às técnicas de marcação Ag-NOR (a, b, c); Cromomicina A3 (d, e, f); FISH com sondas DNAr 18S (g, h, i).

Os sítios de heterocromatina constitutiva evidenciados por bandeamento C foram localizados na região centromérica de todos os cromossomos e, telomérica dos pares 2-10 e 17-20 em amostras oriundas dos ambientes de água branca e água preta

(Figura 3a, c); nos pares 5, 6, 8, 9, 11, 16, 18 e 20 em amostras da população de água clara (Figura 3b). Pequenas variações nos padrões de banda C entre indivíduos da mesma população foram observadas. Além disso, notou-se um heteromorfismo no tamanho da banda C pericentromérica do par 14, porém esta variação não foi consistente com a discriminação de machos e fêmeas (Figura 4).

Os sítios de DNAr 5S foram localizados nos pares 14 e 15. Nas amostras provenientes do ambiente de água preta, as marcações foram conspícuas em ambos os homólogos de cada par. Entretanto, nas amostras oriundas dos ambientes de água branca e água clara um dos homólogos do par 14 mostrou um sinal de intensidade variável, tornando-se às vezes imperceptível, o que ocorreu com maior frequência nas amostras oriundas de água clara. No par 15 o sítio DNAr 5S foi mapeado na região centromérica, enquanto que, no par 14 localizou-se na região subtelomérica do braço longo (Figura 3d, e, f).

O retrotransposon *Rex 3* apresentou um padrão de localização específico para cada tipo de ambiente. Em geral, notou-se uma co-localização do *Rex 3* com as regiões heterocromáticas de banda C, entretanto, esta relação é mais perceptível na amostras oriundas da água branca do que nas da água clara e água preta (Figura 3g, h, i). Nas amostras de água branca a distribuição do retroelemento *Rex 3* foi abundante nas regiões centroméricas e teloméricas, enquanto que, um padrão quase que reverso, com predominância nas regiões teloméricas, foi observado nas amostras provenientes da água clara. No padrão obtido para as amostras da água preta, apenas alguns cromossomos, os pares 3, 4, 7, 9, 14 e 15, evidenciaram a presença do retroelemento *Rex 3*. No par 14, além da marcação centromérica, o *Rex 3* também foi mapeado em uma região intersticial do braço longo.

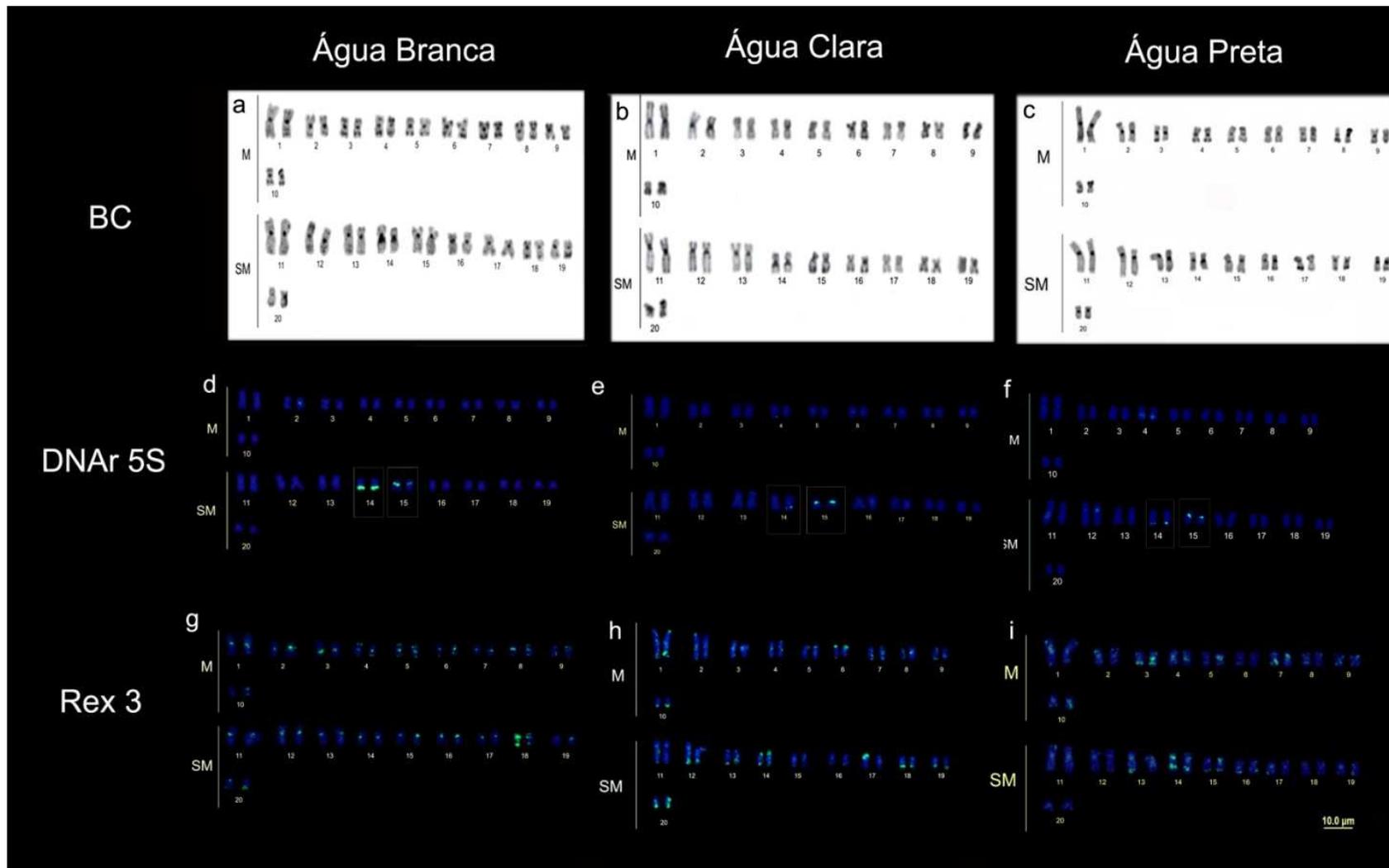


Figura 3: Cariótipos de *Hoplias malabaricus* ($2n=40$) provenientes de ambientes de água branca, água clara e água preta da bacia amazônica, submetidos as técnicas de marcação bandeamento C (a, b, c); FISH com sondas DNaR 5S (d, e, f); FISH com sondas *REX 3* (g, h, i).

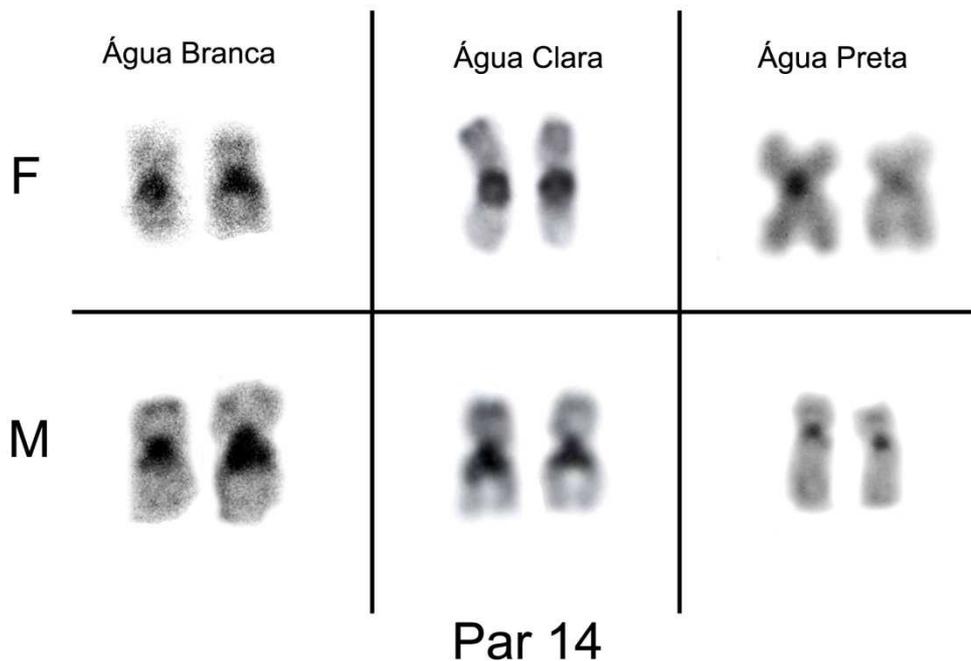


Figura 4: Heteromorfismo da banda C do par 14 de *Hoplias malabaricus* ($2n=40$) de ambiente de água branca e clara.

DISCUSSÃO

O taxon nominal *Hoplias malabaricus* compreende um complexo de espécies que inclui, pelo menos, sete distintos cariomorfos e considera-se que estas linhagens podem constituir espécies independentes (Bertollo *et al.* 2000; Santos *et al.* 2009; Jacobina *et al.* 2011). No presente trabalho analisamos três populações de *H. malabaricus* da bacia amazônica com número diplóide de 40 cromossomos (20M+20SM). Comparando-se com os cariomorfos descritos na literatura encontramos maior similaridade com o cariomorfo C, entretanto, houve variação da fórmula cariotípica e número de sítios Ag-NOR (Cioffi *et al.* 2009a). As principais características que indicam esta semelhança são: o número diplóide, ausência de cromossomos sexual diferenciados morfologicamente, grande diferença de tamanho do primeiro para o segundo par metacêntrico, presença de três pares submetacêntricos grandes (pares 11-13). Quanto à variação observada admite-se que seja um componente natural da diversidade genética da espécie. Blanco *et al.* (2010) já demonstraram a ocorrência de ampla variação citogenética em distintas populações do cariomorfo A.

A ocorrência de NOR múltiplas em *Hoplias malabaricus* tem sido amplamente documentada (Born & Bertollo, 2006; Vicari *et al.* 2006; Santos *et al.* 2009; Cioffi *et al.* 2009a,b). No cariomorfo C, cinco pares organizadores nucleolares (5, 11, 13, 15 e 19) foram detectados em amostras do Rio Bento Gomes, MT (Cioffi *et al.* 2009a). Estes autores demonstraram uma perfeita correspondência entre os sítios Ag-NOR e os sítios de DNAr 18S revelados por FISH, incluindo um sítio conspícuo de localização centromérica no par 11. Em contraste, amostras de cariomorfo C da bacia amazônica, presente estudo, mostraram redução do número de sítios Ag-NOR (2 pares) e DNAr 18S (3 pares). Esta discrepância ocorreu devido a presença de um sítio DNAr 18S intersticial evidenciado apenas por FISH. Este sítio provavelmente corresponde ao que foi mapeado no par 11 por Cioffi *et al.* (2009a) e sua não detecção por nitrato de prata pode ser explicada por um mecanismo de ativação preferencial, uma vez que a técnica de Ag-NOR marca apenas os sítios de DNAr do cistron 45S que foram ativados na intérfase precedente (Hsu *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1976).

Fluorocromos base-específicos tem sido muito utilizado na identificação de subcomponentes da heterocromatina que sejam ricos em pares de bases GC ou AT. Em geral, a Cromomicina A3 tem sido eficiente na detecção de sítios organizadores nucleolares ricos em GC no genoma de peixes (Mayr *et al.*, 1985; Phillips & Hartley, 1988; Almeida Toledo, 1998). No presente estudo, sítios ricos em GC foram co-localizados com a heterocromatina constitutiva centromérica em alguns pares cromossômicos, ocorrendo variação entre os três tipos de ambientes. Por outro lado, não houve associação destes sítios com as regiões organizadoras de nucléolo. É interessante notar que o sítio intersticial de DNAr 18S (Figura 2g, h, i) que se mostrou inativo pela marcação com nitrato de prata, foi também evidenciado pela Cromomicina A3. A falta de associação entre sítios Ag-NOR e CMA3 positivos já foi previamente observada e parece ser uma peculiaridade do genoma de *Hoplias malabaricus* (Vicari *et al.*, 2006, Cioffi *et al.*, 2009b).

Embora a distribuição de heterocromatina constitutiva tenha revelado um padrão comum e compartilhado, exibindo bandas C centroméricas em todos os cromossomos e teloméricas em alguns pares, houve maior acúmulo deste tipo de elemento repetitivo do genoma nas amostras oriundas de água branca. Recentemente, Cioffi & Bertollo (2010) demonstraram no cariomorfo C a presença de um sistema sexual nascente tipo XX/XY, com base na variação de um conspícuo bloco heterocromático presente no par 11. O bandeamento C evidenciou uma pequena variação de tamanho deste bloco

heterocromático no macho, o que foi claramente confirmada por marcação com fluorocromos DAPI/Cromomicina A3 e FISH com sonda DNAr 18S. Todos os marcadores mostraram homomorfismo desta região do par 11 no cariótipo da fêmea. Na variante do citótipo C analisada no presente trabalho podemos verificar que o par 14 corresponde ao par 11 da variante analisada por Cioffi & Bertollo (2010). Isto foi evidenciado tanto pela presença do bloco heterocromático proximal, como pela marcação com a Cromomicina A3 e a sonda DNAr 18S (Figura 2). Portanto, tratamos como estruturas homólogas, confirmando a ocorrência do sistema nascente XX/XY no cariomorfo C da bacia amazônica. O tamanho do bloco heterocromático do par 14 variou entre as populações dos distintos ambientes indicando diferentes estágios da evolução deste sistema cromossômico sexual.

Os arranjos de DNAr 5S parecem ter uma localização preferencial nas regiões intersticiais dos cromossomos e são considerados conservativos, visto que, homologies entre estes elementos já foram estabelecidas entre espécies de diferentes famílias de peixes (Galleti Jr. & Martins, 2004). Todavia, no genoma de *Hoplias malabaricus* tem se demonstrado variação de número e posição dos sítios DNAr 5S entre os diferentes cariomorfos (Born & Bertollo, 2000; Santos *et al.*, 2009; Cioffi *et al.*, 2009a, b).

Em comparação com o padrão já descrito no cariomorfo C (Cioffi *et al.* 2009a), verifica-se a mobilidade do marcador DNAr 5S. Considerando-se a diferença de morfologia cromossômica existente entre as amostras do presente estudo e as analisadas por Cioffi *et al.*, (2009a), podemos sugerir que, o sítio do par 15 corresponde ao do par 12 naquele trabalho, sendo portanto homólogos. Entretanto, o mesmo raciocínio não explicaria o sítio do par 14. Em nossa amostra, este par é caracterizado por conter um elevado conteúdo de elementos repetitivos do genoma, que incluem um sítio DNAr 18S na região proximal, co-localizado com um conspícuo bloco heterocromático na região pericentromérica do braço longo e, por fim o sítio DNAr 5S na posição subterminal do braço longo. Em geral, as famílias gênicas dos RNAr 45S e 5S são situadas em arranjos independentes e em cromossomos distintos (Galleti Jr. & Martins, 2004). Porém, sua ocorrência no mesmo cromossomo já foi documentada em *Salmo salar* e *Oncorhynchus mykiss* (Pendás *et al.*, 1994; Mórán *et al.*, 1996).

A localização do retroelemento *Rex 3* apresentou três padrões distintos que variaram de acordo com o tipo de ambiente de origem da amostra. Vários estudos realizados com o elemento transponível *Rex 3* em outras espécies de peixes, tem demonstrado diferenças quanto ao seu padrão de distribuição, a maioria apresentando

esse elemento disperso no genoma não relacionado a heterocromatina (Martins, 2007). Ozouf-Costaz *et al.*, (2004) estudando os elementos *Rex1* e *Rex3* em 13 espécies de peixes antárticos quanto a dinâmica do genoma e localização cromossômica, verificou que os esses elementos encontravam-se espalhados por toda parte dos cromossomos, com acumulação em algumas regiões particulares, como o cromossomo sexual Y de *Chionodraco hamatus*. Ainda Ferreira *et al.* (2010) analisando os elementos *Rex 1* e *Rex 3* em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae, verificou que estes, também se encontravam dispersos em todos os cromossomos, sendo o elemento *Rex 3* mais abundante.

As diferenças encontradas com relação a quantidade de sítios de *Rex 3* e sua distribuição nos cromossomos de *Hoplias malabaricus* de três ambientes amazônicos, presente estudo; nos permite inferir uma correlação entre os padrões encontrados de *Rex 3* e o ambiente em que vivem. É sabido que fatores geológicos, físico-químicos e biológicos são responsáveis pela grande heterogeneidade de ambientes aquáticos observados na bacia amazônica (Goulding *et al.*, 2003; Val & Almeida-Val, 1995). Essas variações podem exercer sobre a biota aquática processos adaptativos, os quais podem se refletir em mudanças morfológicas, fisiológicas, comportamentais e até mesmo genéticas (Junk *et al.* 1989).

De acordo com Capy *et al.*, (2000) elementos transponíveis podem responder a variações no ambiente celular e externo. Em *Drosophila*, demonstrou-se que o número de cópias do elemento 412 aumenta com a latitude seguindo a diminuição da temperatura (Vieira & Biémont, 1996). A mobilização de elementos transponíveis já foi também demonstrada em organismos amazônicos. Segundo Gross *et al.*, (2009), os padrões de localização do *Rex 3* em *Symphysodon* pode ter um papel na diversidade fenotípica deste grupo e de sua estratégia adaptativa em distintos ambientes da bacia amazônica.

Considerando as diferentes características citogenéticas encontradas em *H. malabaricus* na bacia amazônica, podemos inferir que a variação citogenômica pode ter alguma associação com os processos adaptativos locais da espécie em diferentes condições ambientais. Os mecanismos que modulam as finas variações do genoma ligadas a estes processos adaptativos ainda são pouco compreendidos e estudos futuros são necessários para se testar esta hipótese.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) pela autorização de coleta dos espécimes, à E. M. G. Côrrea, D. F. Marques e V. F. de Oliveira pela ajuda em campo e atividades de laboratório. Somos gratos a Dra. Eliana Feldberg, Leandra Terencio e Carlos Schneider (INPA) pela ajuda nos experimentos de FISH. O estudo foi financiado pela FAPEAM (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas) e recebeu apoio INCT-Adapta Amazônia (CNPq). F. A. Santos recebeu bolsa de mestrado da FAPESPA (Fundação de Amparo a Pesquisa Científica do Estado do Pará).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Toledo, L. F. de. (1998). Cytogenetic Markers in Neotropical freshwater fishes. *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S., eds). pp. 583-587. Porto Alegre: Edipucrs.

Barthem, R. B. (2001). Biodiversidade e funções ecológicas dos ecossistemas: Componentes biota aquática. *In: Biodiversidade na Amazônia Brasileira* (Capobianco, J. P. R. *et al.*, (org)). pp. 60-78. Instituto Socioambiental. São Paulo: Estação Liberdade.

Bertollo, L. A. C., Born, G. G., Dergam, J. A., Fennochio, A. S. & Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* **8**, 603-613.

Bertollo, L. A. C., 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, K. S. & Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces –Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* **2**, 103-120.

Blanco, D. R., 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). *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* **8**, 111-118.

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

Capy, P., Gasperi, G., Biéumont, C. & Bazin, C. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* **85**, 101-106.

Cioffi, M. B. & Bertollo, L. A. C. (2010). Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X₁X₂Y 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**, 1-11.

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. *Cytogenetic and Genome Research* **125**, 132-141.

Donlon, T. A., Lrrr, M., Neucom, S. R. & Magenis, R. E. (1983). Localization of the restriction fragment length polymorphism D14S1 (pAW101) to chromosome 14q32.1-32.2 by in situ hybridization. *Am. J. Human. Genetic.* **35**: 1097-1106.

Ferreira, D.C., Oliveira, C. & Foresti, F. (2010). Chromosome Mapping of Retrotransposable Elements *Rex1* and *Rex3* in Three Fish Species in the Subfamily

Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Research* **132**, 64–70.

Galetti Jr, P. M. & Martins, C. (2004). Contribuição da Híbridização *in situ* para o Conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra, M. (ed). *FISH: Conceitos e aplicações na Citogenética*. pp. 61-88. Ribeirão Preto: editora Sociedade Brasileira de Genética.

Goulding, M. (1997). História natural dos rios amazônicos. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq/Rainforest Alliance.

Goulding, M., Barthem, R., Ferreira, E. (2003). The Negro and the Trombetas – Black and Clear Waters from Ancient Lands. In: *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Washington: Smithsonian Institution Press.

Gross, M. C., Schneider, C. H., Valente, G. T., Martins, C. & Feldberg, E. (2009). Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Research*, 1-11.

Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**, 1014-1015.

Hsu, T. C., Spirito, S. C. & Pardue, M. L. (1975). Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* **53**, 25-33.

Jacobina, U. P., Paiva, E. & Dergam, J. A. (2011). Pleistocene Karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* **9**, 325 – 333.

Junk, W. J.; Bayley, P. B. & Sparks, R. E. (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE, D. P (ed). *Proceedings of the International Large River Symposium*. pp. 106. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.

Komiya, H. & Takemura, S. (1979). Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry* **86**, 1067-1080.

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

Mayr, B., Kalat, M. & Ráb, P. (1985). Localization of NORs and counter-stain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica* **67**, 51-56.

Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R. & Miller, O. J. (1976). Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research* **101**, 235-243.

Móran, P., Martínez, J. L., Garcia-Vásquez, E. & Pendás, A. M. (1996). Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics* **75**, 145-150.

Ozouf-Costaz, C., Brant, J., Körting, C., Pisano, E., Bonillo, C., Coutanceau, J.P. & Volff, J.N. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposon *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science* **16**, 51-57.

Pendás, A. M., Móran, P., Freije, J. P. & Garcia-Vásquez, E. (1994). Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* **67**, 31-36.

Phillips, R. & Harley, S. E. (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome* **30**, 193-197.

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

Santos, U. , Völcker, C. M., Belei, F. A., Cioffi, M. B., Bertollo, L. A. C., Paiva, S. R. & Dergam, J. A. (2009). Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology* **75**, 2326- 2343.

Schweizer, D. (1976). Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Sioli, H. (1984). The Amazon and its main effluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli, H. (ed). *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Netherlands, W. Junk Publications. 127-166.

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

Val, A. L. & Almeida-Val, V. M. F. (1995). *Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features*. Heidelberg: Springer Verlag.

Vicari, M. R., Pazza, R., Artoni, R. F., Margardo, V. P. & Bertollo, L. A. C. (2006). Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origino of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguacu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 297 – 303.

Viera, C. & Biémont, C. (1996). Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. *Journal Molecular Evolution* **42**, 443-451.

Volff, J. N., Hornung, U. & SChartl, M. (2001). Fish retroposons related to the *Penelope* element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 711-720.

Volff, J. N., Korting, C. & Scharl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular and Biology Evolution* **17**, 1673-1684.

Volff, J. N., Korting, C., Sweeney, K. & Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1427-1438.

5. CONCLUSÃO

As três populações de *Hoplias malabaricus* analisadas no presente estudo foram classificadas como pertencentes ao cariomorfo C ($2n=40$, sendo $20m+20sm$). Esta fórmula cariotípica observada nos espécimes da bacia amazônica representa uma variante do cariomorfo C. Embora as três populações tenham conservado a macroestrutura cromossômica demonstrou-se que ocorreu variação citogenômica revelada por marcadores citogenéticos clássicos (banda C, coloração NOR) e moleculares (CMA 3, rDNA18S, rDNA5S, e retrotransposon Rex3). Processos adaptativos locais aos diferentes ambientes aquáticos investigados poderiam estar associados às variações citogenômicas encontradas em *Hoplias malabaricus* da bacia amazônica, principalmente no que se refere aos diferentes padrões de distribuição dos elementos transponíveis Rex3. Entretanto, ainda não está claro o mecanismo de ação que promovem a interação entre elementos genômicos (p.e. Rex3) e a adaptação à variações ambientais.

6 ANEXOS

Anexo 1: Caracterização das amostras de *Hoplias malabaricus* estudadas no presente trabalho.

TIPO DE ÁGUA	Nº DE CAMPO	SEXO	LOCAL DA COLETA	DATA DA COLETA		
Água Branca	AMA – 1	M	Rio Amazonas, Santarém, Pará	19/10/10		
	AMA – 2	M				
	AMA – 4	F				
	AMA – 5	M				
	AMA – 6	F				
	AMA – 7	F				
	AMA – 13	F				
	AMA – 14	M				
	AMA – 15	M				
	AMA – 16	M				
	AMA – 17	F				
	AMA – 18	M				
	ALM- 2	M			Rio Amazonas, Almeirim, Pará	23/07/2011
	ALM- 5	F				
	ALM- 6	M				
	ALM- 8	M				
	ALM- 9	F				
	ALM- 10	F				
ALM-11	F					
ALM-12	F					
Água Clara	JUA- 9	M	Rio Tapajós, Lago Juá, Santarém, Pará	24/09/2011		
	JUA- 13	F				
	JUA- 14	M				
	JUA- 15	M				
	ITA- 47	M			Rio Tapajós, Miritituba, Pará	
	ITA- 48	F				
	ITA- 66	F				
	ITA- 70	M				
	ITA- 71	M				
	ITA- 102	M				
	ITA- 104	F				
	ITA- 105	M				
	ITA- 107	M				
	ITA- 109	M				
	ITA- 110	M				
	ITA- 112	F				
	ITA- 113	M				
	ITA- 114	M				
	ITA- 116	M				
ITA- 117	M					

Anexo I - Continuação.

TIPO DE ÁGUA	Nº DE CAMPO	SEXO	LOCAL DE COLETA	DATA DA COLETA
Água Preta	CTL 10195	NI	Rio Negro, Manaus, Amazonas	12/11/11
	CTL 10224	NI		
	CTL 10244	NI		
	CTL 10409	M		
	CTL 10411	M		
	11.121	M		
	11.122	M		
	11.123	F		
	11.124	M		
	11.125	M		
	11.126	M		
	11.127	M		
	11.128	F		
	11.129	M		
	11.130	M		
	11.131	M		
	11.132	F		
11.133	M			
11.134	M			
11.135	M			

NI – significa sexo não identificado

Anexo 2: Normas da revista Journal of Fish Biology

Author Guidelines

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. *Journal of Fish Biology* welcomes research manuscripts containing new biological insight into any aspect of fish biology. We invite papers that report results and ideas of value to fish biology that will serve a wide international readership. Hence the novelty of the content of manuscripts should have relevance beyond a particular species or place in which the work was carried out. **All material submitted must be original and unpublished, and not under consideration for publication elsewhere.** If in doubt about overlap, please give details of any related work submitted or in press when submitting your manuscript. The *Journal* uses plagiarism detection software, so in submitting your manuscript you accept that it may be screened against previously published literature.

The Fisheries Society of the British Isles (FSBI) considers that scientists should avoid research threatening the conservation status of any species of fish, which is already regarded as threatened according to the IUCN Red List of Threatened Species and the associated Red List Categories and Criteria version 3.1 (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria>) or which is listed as such in a Red Data Book appropriate to the geographic area concerned. In accordance with this view, papers based on such research will not be accepted, unless the work had clear conservation objectives.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centres endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu/).

2. **Submission of manuscripts.** We will consider: Regular papers (original research), Review papers, which will either be invited or agreed with an Associate Editor (see 17), Brief Communications (see 18), Letters (see 19), and Comments and Replies (see 20). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on submissions and authorship in *Journal of Fish Biology* **79**, 1-2 (2011) (available [here](#)). Manuscripts are submitted online at <http://jfb.edmgr.com>, where a user ID and password are assigned on the first visit. Full instructions and support are available on this site. **Authors are expected to suggest potential referees**, selected internationally, for their manuscripts in the 'Suggest Reviewers' section.

3. **Preparation of manuscripts.** Authors should consult a recent issue of *Journal of Fish Biology* for details of style and presentation. **If their manuscript does not follow the format of the Journal, it will be returned to them unreviewed.** Manuscripts must be **double-spaced throughout**, all pages must be numbered and **line numbering set to continuous**, including tables, figure legends and reference lists. **Use a font size \geq 12. Do not save files in PDF (portable document format) format.**

The first page must contain the following information: the title of the paper, name(s) (initials ONLY for forenames) and FULL academic address(es) of ALL author(s); if the address of any author has changed, it should be added as a footnote. Telephone number and email address for the corresponding author (**one only**) should be provided as a footnote. A concise running headline of not more than 45 characters inclusive of spaces should also be given on this page. For regular papers arrange sections in the following sequence: Title page (as a separate page), Abstract and Key Words (as a separate page), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (**a combined Results and Discussion is not acceptable and Conclusions as a heading is only acceptable in Review Papers**), Acknowledgements (for individuals use initials only for forenames and no titles), References, Tables (with captions; see 6 below), Figure captions, Figures and Appendices. Within sections, subdivisions should not normally exceed two grades; decimal number classification of headings and subheadings should not be used (see recent past issues). Footnotes should not be used except in Tables. Spelling must be U.K. English, e.g. Concise Oxford English Dictionary (as distinct from American English) throughout, except in quotations and references. All Latin words (but excluding scientific words other than genus and species) should be in italics. **Do not write text in the first person.**

Do not duplicate information in tables and figures, or *vice versa* or in text and figures. Do not repeat table headings and figure legends in the text. Punctuation should be consistent and only a single space inserted between words and after punctuation. **Do not indicate positions of tables and figures in the text.** Two blank lines should be left after headings and between paragraphs. Text should be typed without end of line hyphenation, except for compound words. Lower case 'l' for '1' or 'o' for '0' should not be used.

4. **Abstract.** This must be concise and summarize **only** the significant findings of the paper (*i.e.* not the background or methods). It should be followed by a list of **\leq 6 key words or key phrases that are not included in the title, with a maximum of 100 characters (including punctuation and spacing).**

5. **Illustrations.** Photographs should be selected only to illustrate something that cannot adequately be displayed in any other manner. Magnification should be given in actual terms and all stains used should be described in full. Colour figures can be included; the first two will be produced free of charge, additional figures will be produced online free of charge, print production will be at the author's expense. Authors must complete a Colour Work Agreement Form for any colour figures requiring payment. This will be indicated on acceptance. The form can be downloaded as a PDF from the home page at <http://jfb.edmgr.com>, or by clicking [here](#). Please note that the Colour Work Agreement Form must be returned by post to the address provided on acceptance. Number figures consecutively using Arabic numerals [Fig. 1, 2, etc.: subdivide by (a), (b), etc.], in order of their mention in the text. A fully descriptive caption must be provided for every figure and the complete list of captions typed together on a separate page. Captions must not be included on the figures. All relevant information, e.g. keys to the symbols and formulae, should be included in the caption. The minimum reduction for the figures may be indicated. Artwork should be received in digital format. Line artwork (vector graphics) should be saved as Encapsulated PostScript (EPS) and bitmap files (half-tones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF). Native file formats should not be submitted. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

6. **Tables.** Number consecutively in Roman numerals (Table I, II, etc.), **in the order of their mention in the text.** Captions for tables should be **typed directly above each table**, not on a separate page. Footnotes to tables should be indicated by superscripts and typed at the bottom of the tables. Tables and figures must 'stand alone' and so all abbreviations must be defined in the figure captions and as footnotes in the tables. Tables, figures and figure captions should be saved in separate files from the main text of the manuscript. Tables should not be embedded in the text file in picture format.

7. **Units and symbols.** Use metric units. Physical measurements should be in accordance with the Système International d'Unités (SI), e.g. mm, mm³, s, g, µg, m s⁻¹, g l⁻¹. Use joules not calories. Authors will find the following two publications helpful: *British Standard 1991: Part I: 1967 Recommendations for Letter Symbols, Signs and Abbreviations and Units, Symbols and Abbreviations. A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* (Baron, D.N., ed.) published by the Royal Society of Medicine, London.

In mathematical expressions, single letters (italics) should be used for variables, qualifying them with subscripts (not italics) if required, e.g. length L , fork length L_F , standard length L_S , index I , gonado-somatic index I_G , hepato-somatic index I_H , etc. The 24 hour clock should be used for time of day, e.g. 1435 hours, not 2.35 p.m. Calendar dates should be as, e.g. 15 June 1998. In the text, one-digit numbers should be spelt out unless they are used with units of measure (in which case they should not be hyphenated), e.g. five boxes, 5 cm. Numerals should be used for all numbers of two or more digits, e.g. 34 boxes. Use mass(es) rather than weight(s). Means and error (S.D., S.E., 95% C.L., etc.), should be to the same number of decimal places. Salinity is dimensionless with no units; do not use psu, ‰ or similar.

8. **Statistics.** Present statistics as follows: name of test, test statistic with associated degrees of freedom (d.f.; note that an F -distribution has TWO d.f. values) and probability level (P). If data conform to all the assumptions of the statistical method used, precise P -values can be given, otherwise P -values should be >0.05, 0.05, 0.01 and 0.001. The P -values given by statistical packages assume that all the assumptions of the statistical method are fully met. Although ANOVA and regression are robust, the real P -values are likely to be different from the values printed by the package, because of violations of the assumptions. Provide confidence intervals (95% C.I.) for parameters estimated by ANOVA and regression analysis. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on reporting statistical results in *Journal of Fish Biology* **78**, 697-699 (2011) (available [here](#))

9. **Species nomenclature.** On first mention of a species name in the main text, the common name of the species, if one is available, followed by the scientific species name (Latin binomial name, in italics) with the describing authority and date of authorship must be given. The common name should not be separated from the scientific name by a comma nor should the species name be in parentheses. The describing authority and date of authorship should not be separated by a comma. For example: the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792); NOT, the rainbow trout, [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)]. First use of species names in the title and Abstract should include common and scientific names as above, but do not require the describing authority and date of authorship.

Use standard sources for species common names, including: Wheeler, A. (1992). A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **41** (Supplement A) (for British fishes); Wheeler, A.C., Merrett, N.R. & Quigley, D.T.G. (2004). Additional records and notes for Wheeler's (1992) *List of the Common and Scientific Names of Fishes of the British Isles. Journal of Fish Biology* **65**, Supplement B (for British fishes); Nelson, J.S., Crossman, E.J., Espinosa-Pérez, H., Findley, L.T., Gilbert, C.R., Lea, R.N. & Williams, J.D. (2004). *Common and scientific names of fishes from the United States, Canada, and Mexico*. Committee on Names of Fishes. 6th edn. Bethesda, MD, U.S.A.: American Fisheries Society (for North American fishes; except those covered above for British fishes); Froese, R. & Pauly, D. (Eds) (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org; *FAO Guides for Fisheries Purposes*.

When first using scientific species names the describing authority name appears in parentheses only if the binomial combination of the name has changed since the original description. *Oncorhynchus clarkii* (Richardson 1836) for example, includes the authority name in parentheses because Richardson initially described the species in the genus *Salmo*, under the name *Salmo clarkia*, whereas the name *Salmo marmoratus* Cuvier 1829 is currently recognized exactly as originally named by Cuvier. When the describing authority is Linnaeus, this should be abbreviated to L., e.g. *Cyprinus carpio* L. 1758. The citation for the original description of a species should not be included in the References unless additional specific details (*i.e.* more than just the species

name) supplied by that publication are discussed in the manuscript. Use the online *Catalog of Fishes* as the standard authority for species nomenclature and date of description: Eschmeyer, W. N. (Ed.) *Catalog of Fishes* electronic version (5 January 2011). <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> After initial use of the species' common and scientific names, subsequent reference to the species should use the scientific name (without describing author or date) NOT the common name. The genus name should be abbreviated to a single letter (e.g. *C. carpio* and *O. mykiss*), except at the start of a sentence or where confusion may arise from multiple genera with the same first letter.

When listing synonyms for a species, the following style is required [based in part on Mincarone & Fernholm *Journal of Fish Biology* (2010) **77**, 779-801]:

Eptatretus cirrhatus (Forster 1801)

Homea banksii Fleming 1822: 375 (original description; type locality: South Seas; holotype: unknown)

Bdellostoma heptatrema Müller 1836: 79 (original description; type locality: South seas; holotype: unknown)

Bdellostoma forsteri Müller 1836: 80 (original description; type locality: Queen Charlotte Sound, New Zealand; holotype: unknown). Conel, 1931: 76 *Bdellostoma forsteri* var. *heptatrema*. Müller, 1838: 174 (new combination)

Bdellostoma cirrhatum. Günther, 1870: 511 (in part). Hutton, 1872: 87 (in part). Putnam, 1874: 160 (in part). Günther, 1880: 27

(Note that species names that are modifications of an existing binomial, rather than an original description, are separated from the author name by a full stop, *Bdellostoma cirrhatum*. Günther, 1870: 511 (in part).

The plural 'fish' should be used for the same species, 'fishes' for more than one species.

Any specimens used for taxonomic analyses should, wherever possible, be deposited in appropriate scientific collections (e.g. museums and university collections, or private collections when there is good evidence that these are adequately maintained), with identifying catalogue numbers, so that they are accessible to the scientific community for subsequent examination and taxonomic revision. **Namebearing type specimens of taxa that are described in the *Journal of Fish Biology* as new to science must be deposited in recognized national or international institutions that can meet Recommendations 72F.1-5 of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999; available [here](#)) for institutional responsibility.** The chosen institute for deposition of name-bearing type specimens should be able to meet these responsibilities into the foreseeable future. A paratype series may be distributed among more than one recognized national or international institution at the discretion of the authors. This is encouraged for paratype series that include numerous specimens, where the paratype series can be split into two or more representative samples, comprising several specimens that are deposited at different institutions. For examples of recognized national or international institutions see earlier taxonomic publications in the *Journal of Fish Biology*, or check institutions listed in Eschmeyer's *Catalog of Fishes Online* (available [here](#)), and see Poss & Collette, *Copeia* **1995**, 48- 70, for U.S. and Canadian institutions. Institutional abbreviations used in manuscripts should follow standard code designations as given in Eschmeyer's *Catalog of Fishes Online* (see link above). Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available [here](#))

10. **Genetic nomenclature.** The *Journal* uses the zebrafish system (see <http://zfin.org/zf/info/nomen.html>) for genes and proteins of fish origin. Genes should be in italic lower case text and proteins in non-italic lower case text with the first letter capitalized. If the genes and proteins are of human origin, use the human nomenclature, with genes in upper case italic text and proteins in upper case non-italic text. Contributors to the *Journal of Fish Biology* should read the Editorial on correct nomenclature in *Journal of Fish Biology* **78**, 1283-1290 (2011) (available [here](#))

11. **Sequence data.** Manuscripts containing novel amino acid sequences (e.g. primer sequences) will only be accepted if they carry an International Nucleotide Sequence Databases (INSD) accession number from the European Biology Laboratory (EMBL), GenBank Data Libraries (GenBank) or DNA Data Bank of Japan (DDBJ). The *Journal of Fish Biology* strongly recommends that when authors deposit data in genetic data banks they include specimen catalogue numbers (for specimens preserved in collections), a note identifying sequences that are derived from type specimens (see 9) and collection locality data. The data base accession number must be given in the Materials and Methods section of the manuscript. For taxonomic papers that refer to sequences derived from specimens preserved in collections (see 9), authors should include a table that clearly links each sequence accession number with the specimen from which it was derived. Sequences from type specimens should also be clearly identified in this Table (**e.g. given in bold text**). A nomenclature for genetic sequences for type specimens has been proposed by Chakrabarty (2010) [Chakrabarty, P. (2010). Genotypes: a concept to help integrate molecular phylogenetics and taxonomy *Zootaxa* **2632**, 67-68] and may be used (but is not obligatory): sequences from holotypes are identified as *hologenotypes*, those from topotypes are *topogenotypes*, and the genetic marker(s) used are incorporated into the nomenclature (e.g. paragenotype ND2). Lengthy nucleotide sequences will only be published in the text if, in the judgement of the Editor-in-Chief, these results are of general interest and importance. **Where sequences are already published, reference to the original source will suffice.**

12. **RAPD.** Data derived by RAPDs (randomly amplified polymorphic DNAs) technology are frequently not satisfactory and conclusions derived from them unreliable. Papers submitted to the *Journal* should not include data generated by this technique.

13. **Acknowledgement of copyright.** Authors should obtain permission from the copyright owner (usually this is the publisher) to use any figure, table or extended quotation from material that has previously been published. Acknowledgements, however, should cite the author: 'Reproduced with permission from Einstein (1975)'.

14. **References.**

The list of references should be arranged alphabetically according to the surname of the first author and set out as follows:

Boisvert, C. A. (2005). The pelvic fin and girdle of *Panderichthys* and the origin of tetrapod locomotion. *Nature* **438**, 1145-1147.
Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T. & Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. In *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 30 (Pederson, R. A. & Schatten, G., eds), pp. 103-145. San Diego, CA: Academic Press.
Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

It is important to include the article's Digital Object Identifier (DOI) (see section 24) in the reference as volume and page information is not always available for articles published online. Please note the following example:

Song, J., Mathieu, A., Soper, R. F. & Popper, A. N. (2006). Structure of the inner ear of bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Fish Biology* **68**, 1767-1781.doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01057.x

The order in the list should be:

- (i). Single authors. Where more than one reference is given for a single author the publications should be listed chronologically.
- (ii). Two authors. These should be arranged first alphabetically, then chronologically. For text citations, use the names of both authors and the year. Do not use *et al.* for two-author references.
- (iii). Three or more authors. These should be arranged chronologically. For all text citations, use the surname of the first author only, followed by *et al.* and the date.

If more than one reference by the same author(s) published in the same year is cited, use *a, b, etc.* after the year in both text and list, e.g. (1963a). Text citations can be given in either of two ways: (a) with date in parentheses, 'as demonstrated by Jones (1956)'; (b) with names and date in parentheses, 'according to recent findings (Jones, 1956)'. **Where more than one reference is cited in the text these should be in chronological order**, e.g. Smith, 1975; Arnold, 1981; Jones, 1988. **Journal titles must be given in full.** Provide names and initials of **all** authors, the full title of the paper, the volume number and the page numbers.. **Authors should check that all citations in the text are in the list of references and vice versa**, and that their dates match. Journal titles, book titles and any other material within the reference list which will be italicized in print should be italicized or underlined in the manuscript.

References must be available in the public domain, e.g. 'do not include grey' literature.

List electronic references separately, under the heading **Electronic References**, and set out as follows:

ICES (2001). Report of the Northern Pelagic and Blue Whiting Fisheries Working Group. *ICES CM 2001/ACFM:17*. Available at <http://www.ices.dk/reports/acfm/2001/wqnpbw/wqnpbw01.pdf> (last accessed 6 April 2010).

All articles on Wiley Online Library (<http://wileyonlinelibrary.com>) include full details on how to cite the article.

15. Supporting Information. As a service to authors and readers, the *Journal of Fish Biology* will host supporting information online. Supporting Information files are hosted by the Publisher in the format supplied by the author and are not copy-edited by the Publisher. **It is the responsibility of the author to supply Supporting Information in an appropriate file format and to ensure that it is accurate and correct. Authors should therefore prepare Supporting Information with the same rigour as their main paper, including adherence to journal style (e.g. formatting of references).** Supporting Information can be provided as separate files or as one combined file. Authors are discouraged from supplying very large files or files in non-standard file formats, both of which may reduce their use to the readership. Files should be prepared without line numbers or wide line spacing, and with all track-change edits accepted. Supporting Information files containing videos and animations are accepted.

16. Ethics. Contributors to the *Journal of Fish Biology* must read the Editorials on ethics in *Journal of Fish Biology* **68**, 1-2 (2006) (available [here](#)) and *Journal of Fish Biology* **78**, 393-394 (2011) (available [here](#)). They will be required to complete a questionnaire on submission of their paper, available for downloading [here](#).

17. Reviews. Reviews should be concise, critical and creative. They should seek to stimulate topical debate and new research initiatives. Prospective authors are asked to submit a synopsis (two pages maximum) of their paper to an Associate Editor. The Editor-in-Chief can be consulted to advise on the appropriate Associate Editor to be approached. The synopsis should outline why the review is topical, its main points and objectives, and how it will stimulate debate and research. When the proposal has been accepted by an Associate Editor, he or she will invite the author to submit a manuscript, following the Instructions for Authors, within an agreed time limit.

18. Brief Communications. A Brief Communication may be concerned with any subject within the scope of the *Journal of Fish Biology* but should be **confined to a single point or issue of progress**, such as an unusual

occurrence, an interesting observation, or a topical and timely finding. The manuscript must, however, have some relevance beyond the species or locality under consideration. To qualify for inclusion as a Brief Communication a paper **must be short (five printed pages maximum; c. 2500 words)**. An abstract of not more than three sentences is required. **No subheadings or subdivisions should be included**. In other respects submitted manuscripts should comply with the instructions given above.

19. **Letters.** These must be very short (**one and a half printed pages maximum; c. 750 words**) and deal with single significant finding or point for discussion that needs rapid publication. Include title page, abstract (one or two sentences) and key words, main text and references (no tables or figures).

20. **Occasional Comments.** Comments concerning recent published papers in the *Journal* may be considered by the Editor-in-Chief. The comments will be sent to the original authors to provide an opportunity for reply. Publication of the Comment and Reply will end the debate.

21. **Acceptance of papers.** Papers will normally be critically reviewed by two or more independent experts in the relevant discipline and evaluated for publication by the Editors, but the Editors may return to authors without review any manuscripts deemed to be of inadequate quality or inappropriate for the *Journal of Fish Biology*. The final decision to accept a paper will be made by the Editor-in-Chief.

22. **Copyright.** Authors submitting a manuscript do so on the understanding that, if it is accepted for publication, the licence to publish the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the FSBI. The submission of an exclusive licence to publish is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production until this has been received. The Exclusive Licence Form can be downloaded from the home page at <http://jfb.edmgr.com> or, alternatively, please [click here](#). This should be signed by the appropriate person(s) and must be sent offline, by post, to the Managing Editor. **Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.**

23. **Online Open.** OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. The full list of terms and conditions, can be found [here](#). Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from [here](#). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the *Journal's* standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

24. **Proofs and offprints.** Proofs are downloaded as a PDF file from a designated web site. Full details will be sent to the corresponding author by email. Therefore, a working email address must be provided. Proofs should be returned to the Managing Editor within 3 days of receipt. Free access to the final PDF offprint of the article will be available *via* author services only. Authors must therefore sign up for author services to access the article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. In addition to this electronic offprint, paper offprints may be ordered online. Full instructions for ordering paper offprints will be sent with the proofs. Any queries regarding offprints should be emailed to: offprint@cosprinters.com. Paper offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive; however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive.

25. **Early View.** *Journal of Fish Biology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final, and no changes can be made after online publication. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Early View articles lack a volume, an issue and page numbers, and cannot be cited in the traditional way. Instead they have a DOI, which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

26. **Author material archive policy.** Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material 2 months after publication. If the return of any submitted material is required, the Managing Editor or Production Editor must be informed as soon as possible.

27. **Queries.** Contact the Managing Editor at journal.fishbiology@btopenworld.com.