



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**DIEGO FERREIRA MARQUES**

**DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR (DNA *BARCODE*) NO  
COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA  
REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS**

**Santarém – Pará**

**2011**

**DIEGO FERREIRA MARQUES**

**DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR (DNA *BARCODE*) NO  
COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA  
REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia - Universidade Federal do Oeste do Pará/Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia - Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia.

**ORIENTADOR:** PROF. Dr. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES

**CO-ORIENTADOR:** PROF<sup>a</sup>. Dra. SIMONI SANTOS DA SILVA

**Santarém - Pará  
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Ruy Barata/UFOPA**

---

- M357d Marques, Diego Ferreira  
Diversidade cromossômica e molecular (DNA BARCODE) no complexo *Hoplias malabaricus* (Chacariformes, Erythrinidae) da Região do Baixo Amazonas / Diego Ferreira Marques. – Santarém, 2011.  
71 f.: il; 30 cm.  
Inclui bibliografias.
- Orientador Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues; Co-orientador Simoni Santos da Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2011.
1. Peixes – Estudos. 2. *Hoplias malabaricus* (Traira). 3. Citogenética. 4. Cromossomos. I. Rodrigues, Luis Reginaldo Ribeiro, orient. II. Título.

CDD: 21 ed. 597.48098115

---

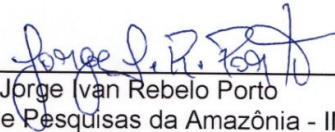
DIEGO FERREIRA MARQUES

DIVERSIDADE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR (DNA *BARCODE*) NO  
COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA  
REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS

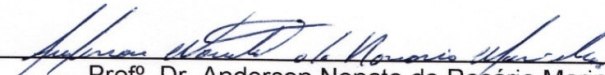
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia - Universidade Federal do Oeste do Pará/Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia - Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia.

Aprovado em: 28 de Março de 2011

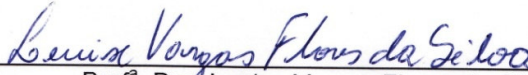
BANCA EXAMINADORA



Prof.º Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto  
(Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA)



Prof.º Dr. Anderson Nonato do Rosário Marinho  
(Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA/ICED)



Prof.ª Dra. Lenise Vargas Flores da Silva  
(Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA/ICTA)

Santarém  
2011

## AGRADECIMENTOS

### À DEUS.

Palavras não serão suficientes pra demonstrar o porquê que devo agradecer a minha **FAMÍLIA**. Obrigado pelo exemplo de honestidade, sinceridade, caráter e afetividade.

À meus **PAIS** (Ana e Bosco) por ter me ajudado e me apoiado em todas as dificuldades que fui levado a lidar. Obrigado por ser flexíveis e rido quando necessário, e muito obrigado por ainda estarem presentes de forma muito sólida em minha vida. Agradeço também a meus avós (Ana e João) por serem a minha válvula de escape nos momentos de maior pressão que enfrentei, por acordar cedo e não deixar que fosse trabalhar sem levar o almoço de cada dia.

À meus **IRMÃOS** (Dannylo, Danyel, Dulcyana) pelo apoio, e pela companhia diária, amo vocês. Abraço também ao cunhado Moisés.

À **SEGUNDA FAMÍLIA**, irmãos do laboratório. Durante esse período convivi mais tempo com vocês do que com minha própria família, muitos de nós seguiremos caminhos opostos mas vou sempre levar os momentos que passamos juntos, os ensinamentos, as brincadeiras e as brigas, que nos fizeram unir mais. Obrigado a todos: Eloíza, Fabíola, Jonas, Rafael, Bia, Talita, Aline, Erika, Fábio, Marcos prado e também a um grande amigo que me ajudou em muitos experimentos: Vinícius. Abraço também a grande amiga Jennefer a quem sou muito grato pelas conversas e pela ajuda no laboratório.

Aos **AMIGOS DE TURMA**, que apesar de ter sido composta por apenas 10 (2 times de futsal) a convivência foi essencial para enfrentar os desafios propostos durante a realização dos trabalhos.

Aos **PROFESSORES** do PGRNA, pelos ensinamentos não só de assuntos técnicos e metodológicos mas também de relacionamentos de professores a alunos. A professora Rosa que me sempre esteve disposta a me ajudar e ao professor Cosme que sem nem me conhecer, paralisou vários dias de sua própria excursão para que eu pudesse coletar traíras.

Dedico esse parágrafo ao cara que acreditou desde o início que eu era capaz de realizar um trabalho tão complexo para alguém que nunca tinha trabalhado em genética na vida. Que muitas vezes foi um pai e amigo, sempre esteve disposto a me ajudar e ensinar; enfim me mostrar o caminho da ciência. Muito obrigado por tudo professor **LUIS**.

Obrigado à professora **SIMONI** por ter tido paciência, e ser exemplo pra mim quando estive realizado os procedimentos de biologia molecular em Bragança. Aproveito também para agradecer a outras pessoas que lá foram essenciais para que uma parte desse sonho se tornasse realidade; primeiramente aos

**PROFESSORES:** Péricles, Juliana, Grazielle, Marcelo, Iracilda e principalmente à professora Wilsea que sem nem me conhecer foi solidária a mim desde o primeiro dia que estive em Bragança, sempre com seu jeito amável me fez acreditar que eu seria capaz de fazer um bom trabalho mesmo quando meus PCRs me mostravam o contrario.

Agradeço aos **AMIGOS DE BRAGANÇA** que sem eles não teria suportado o tempo que passei longe da minha família, obrigado Rosa por ter me acompanhado e me ajudado em meus experimentos, obrigado Davison (folha), Tatiana, Valéria, Yrlene, Salene, Elizandra, Marcela, Glaucia e especialmente à Mariana e Ivana

Como não poderia deixar de citar; agradeço também aos amigos de outros laboratórios em especial a Valéria (eterna rosinha) e às meninas que trabalham incansavelmente na secretaria do PGRNA.

Agradeço também aos **AMIGOS DO LABORATÓRIO CITOGENÉTICA** de Belém (Adauto, Nathália, Ramon e Anderson) por me ajudarem quando precisei fazer meus experimentos de FISH, deixando muitas vezes seus próprios trabalhos para me auxiliar quando precisei. Agradeço Também aos professores Júlio e Cleusa que me aceitaram como estagiário e serem muito atenciosos.

Obrigado aos **AMIGOS DO LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA ANIMAL** de Manaus (Leandra, Leila, Carlos e Claudia) pelo treinamento de FISH em nosso laboratório e principalmente por estarem sempre dispostos a discutir a metodologia do meu trabalho o qual em muitos aspectos surgiu graças às conversas informais no intervalo das técnicas, e serem bastante atenciosos para responder meus emails. Obrigado também à professora Eliana e ao amigo Jorge pelos conselhos no primeiro evento científico em que apresentei um trabalho.

Gostaria de agradecer também aos órgãos que forneceram apoio financeiro para realização desse trabalho: CAPES, INCT-Adapta, PGRNA.

MUITO OBRIGADO!!!!

***DEDICATÓRIA***

À minha família, que sempre esteve do meu lado mesmo quando minha  
decisão poderia interferir em suas vidas.

***EPÍGRAFE***

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier



## RESUMO

*Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como traíra é classificada em Erythrinidae, Ordem Characiformes. Estudos citogenéticos demonstraram grande variação cromossômica entre populações, sendo classificadas em sete citótipos(A-G).Dados moleculares evidenciam altos índices de divergência genética e apóiam a hipótese que o táxon nominal *Hoplias malabaricus* seja um complexo de espécies, formado por unidades biológicas independentes. Os estudos genéticos em populações de traíra na Bacia Amazônica são escassos e todos os trabalhos desenvolvidos até hoje nesse táxon não evidenciam de forma precisa relações moleculares e cromossômicas capazes de discriminar o número real de espécies dentro desse complexo. O presente trabalho visou caracterizar a diversidade cromossômica e molecular utilizando a metodologia do DNA *BARCODE* no complexo *H. malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) da região do baixo Amazonas. Para isso foram coletados 59espécimes de *H. malabaricus* de oito localidades da região do baixo Amazonas no Estado do Pará. Foram realizadas 53 preparações cromossômicas, análise convencional para descrição do citótipo correspondente, técnicas de bandeamento C, detecção de NOR por marcação com AgNO<sub>3</sub> e hibridização por fluorescência (FISH) com sonda rDNA 18S, bem como marcação das regiões ricas em GC por cromomicina (CMA<sub>3</sub>); para análise molecular foram sequenciadas 54 amostras do gene citocromo oxidase subunidade I (*Cox I*) sendo que as distâncias genéticas foram estimadas adotando-se os métodos de agrupamento de vizinhos com o modelo K2P, usando-se o programa MEGA e ferramentas online do BOLD.As relações genéticas entre haplótipos foram evidenciadas com o método Median-Joining usando-se o programa NETWORK. O estudo evidenciou a presença de quatro citótipos: A, C, E e G; padrões de NOR evidenciam diferentes marcações tanto entre citótipos quanto entre pontos de coleta sendo o padrão de bandeamento C homogêneo por citótipo. A rede de haplótipos mostra que há fluxo gênico entre as populações e os índices de divergência elevados entre os citótipos A, E e G comparados com o citótipo C, entretanto, não foi possível uma separação total por citótipos quando os quatro foram testados conjuntamente. Por outro lado, a análise de DNA *Barcode* revelou claramente dois grupos, que podem caracterizar a presença de espécie não descrita na população de *H. malabaricus* do baixo Amazonas. Este se caracteriza como o primeiro trabalho que visa a discriminação de espécies do complexo *Hoplias malabaricus*, correlacionando dados com marcadores citogenéticos e moleculares contribuindo na validação da eficácia do DNA *Barcode*.

Palavras-Chave: *Hoplias malabaricus*. Complexo de espécies. Citogenética. DNA*Barcode*.

## ABSTRACT

*Hoplias malabaricus*, popularly known as trahira is classified in Erythrinidae, Order Characiformes. Cytogenetic studies showed high chromosomal variation among populations, have been classified into seven cytotypes (A-G). Molecular data evidenced high levels of genetic diversity and support the hypothesis of *H. malabaricus* as a species complex, including independent biological units. Genetic studies in populations of trahiras in the Amazon Basin are scarce and the studies developed so far rarely resolved this species complex. This work describes the molecular and chromosomal diversity in the complex *H. malabaricus* from Amazon basin. Were collected 59 specimens from eight localities in the lower Amazon River, state of Pará, Brazil. For chromosomal analysis, it was processed conventional staining, C-banding, Ag-NOR staining, CMA<sub>3</sub> staining and FISH with 18S rDNA probes. For molecular analysis the genetic distances were accessed from DNA barcode sequences (gene *cox 1*) using Neighbor-joining with K2P model, and median joining for haplotype network. The study showed the presence of distinct karyotypes with diploid numbers of 40, 41 and 42, that were classified in four cytotypes: A, C, E and G; NORs showed different number and locations between cytotypes and collection points. The C-banding pattern was homogeneous within each cytotype. DNA Barcode analysis clearly revealed two groups, which can indicate the presence of an undescribed *Hoplias* in the lower Amazon region. This is the first work in the lower Amazon that aim to discriminate species of the *Hoplias malabaricus* complex, correlating data with cytogenetic markers and contributing to the molecular validation of the efficacy of DNA Barcode.

Keywords: *Hoplias malabaricus*. Species complex. Cytogenetics. DNA Barcode.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 SISTEMÁTICA DE ERYTHRINIDAE COM ÊNFASE NO GÊNERO <i>HOPLIAS</i> .....	14
1.2 MORFOLOGIA E ECOLOGIA DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	16
1.3 GENÉTICA DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	17
1.4 FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE.....	20
<b>1.4.1 Marcadores citogenéticos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.2 Código de barras do DNA (DNA <i>barcode</i>).....</b>	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 COLETAS E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	25
3.2 MÉTODOS CITOGENÉTICOS.....	28
<b>3.2.1 Preparação cromossômica e análise do cariótipo.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) por Nitrato de Prata e FISH.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4 Detecção de sítios ricos em GC pelo fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>.....</b>	<b>31</b>
3.3 MÉTODOS MOLECULARES.....	32
<b>3.3.1 Extração de DNA genômico.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2 Isolamento e amplificação do gene <i>cox I</i> (DNA <i>barcode</i>).....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.3 Purificação e Sequenciamento.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.4 Análise das sequências de DNA Barcode.....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	36
4.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	44
<b>4.2.1 Diversidade Genética.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.2 Análise de agrupamentos.....</b>	<b>45</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm – Centímetros

mm – Milímetro

RAPD – Amplificação ao acaso de DNA polimórfico

mtDNA – DNA mitocondrial

RNA – Ácido ribonucleico

% - Por cento

NOR – Região organizadora de nucléolo

FISH – Hibridização in situ por fluorescência

DAPI – Diamidino Fenil indol

DNA – Ácido desoxiribonucleico

cox I – Citocromo oxidase subunidade I

°C – Graus Celsius

mL – mililitro

L – litro

g/L – Gramas por litro

v:v – Volume por volume

RPM – Rotações por minuto

μL – Microlitro

HCl – Ácido Clorídrico

Ba (OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de Bário

xSSC – Solução salina de Cloreto de sódio+Citrato de sódio

AgNO<sub>3</sub> – Nitrato de prata

PCR – Reação em cadeia da polimerase

FITC – Fluoresceína isotil cianato

CMA<sub>3</sub> – Cromomicina

AcNa – Acetato de sódio

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição dos gêneros e espécies da família.....	15
<b>Tabela 2:</b> Número diplóide, sistema sexual e distribuição geográfica de alguns exemplares de <i>H. malabaricus</i> .....	18
<b>Tabela 3:</b> Caracterização da amostra de <i>Hoplias malabaricus</i> proveniente da região do Baixo Amazonas-PA.....	26
<b>Tabela 4:</b> Caracterização do coquetel de <i>primers</i> utilizados para o isolamento do gene <i>cox I</i> .....	33
<b>Tabela 5:</b> Caracterização citogenética de citótipos do complexo <i>Hoplias malabaricus</i> provenientes da região do Baixo Amazonas.....	36
<b>Tabela 6:</b> Divergência nucleotídica média nos grupos de <i>Hoplias malabaricus</i> (Gp1 e Gp2) e grupos externos ( <i>Rhamdia</i> e <i>Hepsetus</i> ).	47
<b>Tabela 7:</b> Distância média entre os grupos de <i>Hoplias malabaricus</i> (Gp1 e Gp2) e grupos externos ( <i>Rhamdia</i> e <i>Hepsetus</i> ).....	47
<b>Tabela 8:</b> Distância média entre os citótipos A e C de <i>Hoplias malabaricus</i> .....	49
<b>Tabela 9:</b> Distância média entre os grupos de <i>Hoplias malabaricus</i> do citótipo C, citótipo G e grupo externo.....	50
<b>Tabela 10:</b> Variação cariotípica dentro do citótipo A.....	56
<b>Tabela 11:</b> Variação cariotípica dentro do citótipo C entre amostras dos estados do Pará e do Mato Grosso.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exemplar de <i>Hoplias malabaricus</i> .....	16
Figura 2: Etapas da metodologia de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	20
<b>Figura 3:</b> Mapa das localidades de coleta amostradas no presente estudo.....	27
<b>Figura 4:</b> Cariótipo em coloração convencional e NOR.....	37
<b>Figura 5:</b> Coloração com nitrato de prata e marcação dos sítios 18S.....	38
<b>Figura 6:</b> Padrão de bandeamento C.....	39
<b>Figura 7:</b> Cariótipo em coloração convencional do espécime e NOR.....	39
<b>Figura 8:</b> Detecção de NOR por FISH com sonda rDNA18S em <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	40
<b>Figura 9:</b> Localização de sítios ricos em GC em <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	40
<b>Figura 10:</b> Padrão de bandeamento C em <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	41
<b>Figura 11:</b> Cariótipo de <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	42
<b>Figura 12:</b> Cariótipo em coloração convencional de <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	43
<b>Figura 13:</b> Localização de sítios ricos em GC de <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	43
<b>Figura 14:</b> Composição nucleotídica do gene <i>cox I</i> (651 pb) em 54 espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> provenientes da região do Baixo Amazonas.....	44
<b>Figura 15:</b> Distribuição da divergência nucleotídica intraespecífica em <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas (n=54).....	45
<b>Figura 16:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos sob modelo K2P obtida a partir de seqüências DNA Barcode em <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	46
<b>Figura 17:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir do DNA Barcode em <i>Hoplias malabaricus</i> (citótipo C) da região do Baixo Amazonas.....	48

<b>Figura 18:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de <i>Hoplias malabaricus</i> (citótipos A e C) da região do Baixo Amazonas.....	49
<b>Figura 19:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de <i>Hoplias malabaricus</i> (citótipos C e G) da região do Baixo Amazonas.....	50
<b>Figura 20:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de <i>Hoplias malabaricus</i> (citótipos C e E) da região do Baixo Amazonas.....	51
<b>Figura 21:</b> Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de <i>Hoplias malabaricus</i> (citótipos A, C e E) da região do Baixo Amazonas.....	52
<b>Figura 22:</b> Árvore de agrupamento de vizinhos (K2P) de haplótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	53
<b>Figura 23 :</b> Rede de haplótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> da região do Baixo Amazonas.....	54
<b>Figura 24:</b> Representação da rede de haplótipos das populações estudadas. Óbidos está representando os dois pontos de coleta da região desse município.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SISTEMÁTICA DE ERYTHRINIDAE COM ÊNFASE EM *Hoplias*

Os Characiformes compreendem um grupo diversificado, que abrange 18 famílias, 270 gêneros e pelo menos 1674 espécies, com distribuição na região Neotropical e na África. Erythrinidae (Characiformes) é formada por três gêneros: *Erythrinus* Scopoli (1977), *Hoplerythrinus* Gill (1895) e *Hoplias* Gill (1903), e cerca de 14 espécies. Estudos morfológicos indicam que Erythrinidae forma um clado com Lebiasinidae, Ctenoluciidae e Hepsetidae, o qual foi denominado de superfamília Erythrinioidea (NELSON, 2006). Embora este agrupamento tenha recebido apoio de diferentes autores, não há consenso quanto ao número de famílias que constituem Erythrinioidea. Estudos mais recentes sugerem a adição de Alestidae, Acestrorhynchidae e Crenuchidae (CALCAGNOTTO *et al.* 2005; NETTO-FERREIRA, 2005). A posição filogenética de Erythrinidae dentro de Erythrinioidea é controversa tendo sido apontada como grupo irmão de Ctenoluciidae (VARI, 1995), de Hepsetidae (ORTÍ e MEYER, 1997) e de Lebiasinidae (LUCENA, 1993; BUCKUP, 1998; OYAKAWA, 1998; NETTO-FERREIRA, 2005; MOREIRA, 2007).

A família Erythrinidae se distribui na América do Sul e parte da América Central, e ocorre em habitats variados, tais como, lagos, lagoas, pequenos e grandes rios. Com exceção de *H. malabaricus*, que aparentemente ocorrem em todas as bacias hidrográficas da América do Sul, as outras espécies de *Hoplias* são restritas a pequenas áreas (OYAKAWA, 2003).

Os eritrinídeos são comumente chamados de traíras, trairões, jejus e marobás. Segundo Oyakawa (2003), *Hoplias* é grupo irmão de *Erythrinus-Hoplerythrinus*. O gênero *Erythrinus* é formado por *E. erythrinus* (BLOCH e SCHNEIDER, 1801) e *E. kessleri* (STEINDACHNER, 1876), enquanto que, *Hoplerythrinus* compreende *H. cinereus* (GILL, 1858), *H. gronovii* (VALENCIENNES, 1847) e *H. unitaeniatus* (AGASSIZ, 1829).

O gênero *Hoplias*, por sua vez, é taxonomicamente confuso. Oyakawa (2003) reconheceu nove espécies e classificou-as em três grupos: **1) grupo lacerdae** - *H. aimara* (VALENCIENNES, 1847), *H. brasiliensis* (SPIX e AGASSIZ,



1829), *H. lacerdae* (MIRANDA RIBEIRO, 1908), *H. microcephalus* (AGASSIZ, 1829), *H. microlepis* (GÜNTHER, 1864), *H. patana* (VALENCIENNES, 1847) e *H. teres* (VALENCIENNES, 1847); **2) grupo malabaricus** - *H. malabaricus* (BLOCH, 1794) e **3) grupo macrophthalmus** - *H. macrophthalmus* (PELLEGRIN, 1907).

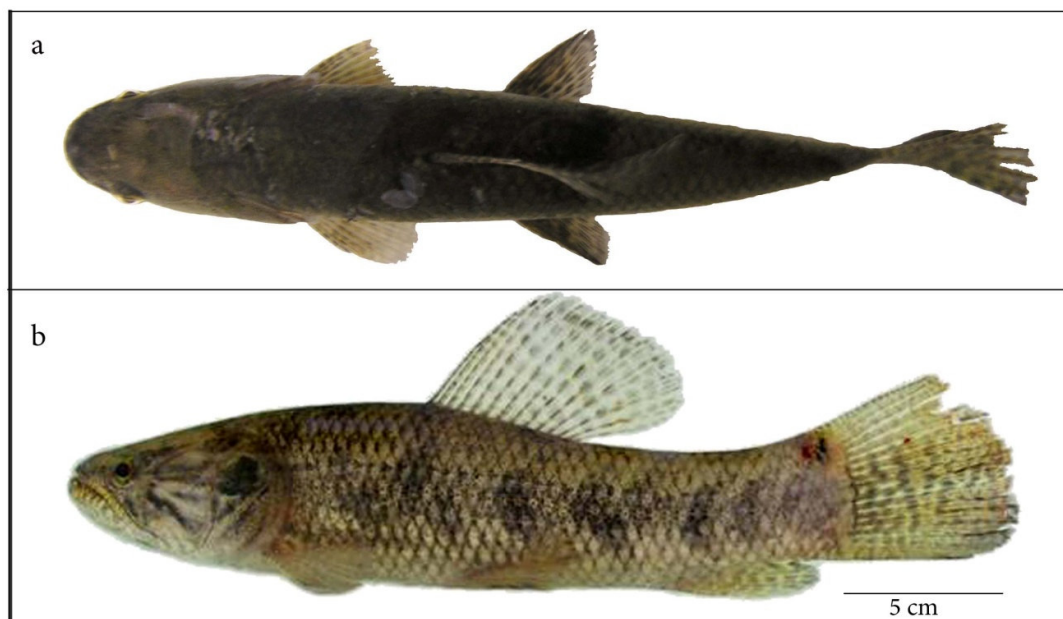
Com a descoberta de duas novas espécies *H. curupira* e *H. australis* (OYAKAWA e MATTOX, 2009), e revisão taxonômica na qual as espécies, *Hoplias macrophthalmus* e *H. aimara* foram sinonimizadas (MATTOX *et al*, 2006). Em *Hoplias*, atualmente, é definida uma divisão em dois grupos de espécies: grupo *lacerdae*, recentemente revisado, que inclui nove espécies; e grupo *malabaricus* que inclui uma única espécie nominal, *Hoplias malabaricus*, que supostamente trata-se de um complexo de espécies crípticas ainda não descritas. Este grupo necessita de revisão taxonômica (Tabela 1).

**Tabela 1:** Composição dos gêneros e espécies da família Erythrinidae (Oyakawa, 2003; Oyakawa e Mattox, 2009).

Gênero		Espécie
<i>Erythrinus</i>		<i>E. erythrinus</i> (BLOCH e SCHNEIDER, 1801)
		<i>E. kessleri</i> (STEINDACHNER, 1876)
<i>Hoplerythrinus</i>		<i>H. cinereus</i> (GILL, 1858)
		<i>H. gronovii</i> (VALENCIENNES, 1847)
		<i>H. unitaeniatus</i> (AGASSIZ, 1829)
<i>Hoplias</i>	Grupo <i>lacerdae</i>	<i>H. aimara</i> (VALENCIENNES, 1847)
		<i>H. brasiliensis</i> (SPIX e AGASSIZ, 1829)
		<i>H. lacerdae</i> (MIRANDA RIBEIRO, 1908)
		<i>H. microcephalus</i> (AGASSIZ, 1829)
		<i>H. microlepis</i> (GÜNTHER, 1864)
		<i>H. patana</i> (VALENCIENNES, 1847)
		<i>H. teres</i> (VALENCIENNES, 1847)
		<i>H. curupira</i> (OYAKAWA e MATTOX, 2009)
		<i>H. australis</i> (OYAKAWA e MATTOX, 2009)
		Grupo <i>malabaricus</i>

## 1.2 MORFOLOGIA E ECOLOGIA DE *Hoplias malabaricus*

Os espécimes de *Hoplias malabaricus* atingem em média 50cm de comprimento total; o corpo apresenta formato cilíndrico e abdome com contorno abaulado; a coloração é cinza-escura a amarronzada. Na região dorsal e lateral notam-se manchas escuras irregulares, inclinadas, às vezes com barras angulares ao longo dos flancos. As nadadeiras apresentam faixas formadas por pequenas manchas escuras e claras, alternadamente. A nadadeira caudal possui base reta e extremidade arredondada; a dorsal com 12 a 15 raios com pontos escuros e ordenados formando faixas. A linha lateral possui 39 a 43 escamas e seis séries de escamas acima da linha e de 4,5 a 5,5 séries abaixo. A cabeça é robusta e bastante ossificada, apresentam dentescônios e caniniformes, de diversos tamanhos efirmente implantados em ambas as maxilas; língua áspera, provida de dentículos, sempre quatro poros do sistema látero-sensorial cefálico em cada lado do dentário e as margens inferiores dos dentários convergindo em direção à sínfise mandibular (SANTOS *et al*, 2004; SANTOS *et al*, 2006; OYAKAWA e MATTOX, 2009).



**Figura 1:**Exemplar de *Hoplias malabaricus*. (a) Plano dorsal, (b) Plano lateral.

*Hoplias malabaricus* possui comportamento sedentário, podendo ser encontrados em ambientes fluviais e lacustres, pois preferem águas paradas,

principalmente lagos, açudes, matas inundadas, córregos e igarapé são capazes de suportar ambientes com baixíssimas concentrações de oxigênio (KOCK *et al*, 2000; VICARI e BERTOLLO, 2001; SANTOS *et al*, 2006). Possuem a capacidade de se mover fora d'água e atravessar pequenos trechos lodosos, graças a isso, normalmente fazem migração entre um corpo d'água e outro através da vegetação ou terreno úmido (SANTOS *et al*, 2004; 2006).

As traíras são peixes carnívoros predadores de insetos aquáticos, camarões e pequenos peixes, que capturam com a estratégia de emboscada. As formas jovens são onívoras, alimentando-se de algas, larvas de insetos e peixes (CASTRO e CASATTI, 1997; OYAKAWA, 2003; BRITO, 2003; SANTOS *et al*, 2004; 2006).

Com cerca de um ano, alcançam aproximadamente 15 cm de comprimento total e já apresentam maturidade sexual. O período de desova é longo, sendo esta de forma parcelada, abrangendo cerca de cinco meses, mas o pico da desova ocorre geralmente no começo do período de cheia dos rios (MARQUES *et al*, 2001).

Em ambiente natural, a fecundidade é baixa, em torno de 2.500 a 3.000 ovócitos, que apresentam diâmetro em torno de 2mm. Durante a desova, os reprodutores preparam ninhos, fazendo ou limpando depressões do terreno, em águas rasas e os ovos são guardados pelo macho. Estudos experimentais de reprodução assistida revelaram que as traíras possuem fecundação externa, ovos adesivos, com alta taxa de fecundação outro fato interessante observado foi que quando se reduziu o volume de água no tanque, obteve-se a reprodução em menor intervalo de tempo (QUEROL *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2004; 2006).

De acordo ainda com o mesmo autor, apesar de não ser considerada uma espécie de alto valor comercial, sendo pouco explorada comercialmente na região amazônica, a traíra tem uma grande importância na pesca de subsistência, pois, além da sua ampla distribuição, é facilmente capturada com anzol e linha.

### 1.3 GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus*

Estudos citogenéticos na Família Erythrinidae, principalmente no gênero *Hoplias*, iniciaram-se na década de 70 do século passado. Desde então, os resultados obtidos tem revelado evidências da alta diversidade cariotípica,

mostrando diferenças interpopulacionais no número diplóide e na morfologia cromossômica, assim como na presença/ausência e constituição de sistemas cromossômicos sexuais. De acordo com Bertollo *et al.* (2000), os dados obtidos em populações de trinta e seis localidades, no Brasil, Argentina, Uruguai e Suriname, evidenciaram a ocorrência intra-específica de sete formas cromossômicas distintas (Tabela 2), denominadas como citótipos, termo este que será adotado no presente trabalho.

Os citótipos de *Hoplias malabaricus* foram classificados por letras de A-G e com base em comparações cariotípicas e ocorrência geográfica sugere-se que as formas cariotípicas podem ser classificadas em dois grupos de citótipos: **grupo 1) citótipos A-D:** possuem números diplóides diferenciados com mesma macroestrutura cariotípica, sugere-se que a citótipos B e D, com sistemas sexuais cromossômicos diferenciados evoluíram a partir de formas semelhantes aos citótipos A e C, respectivamente; **grupo 2) citótipos E-G:** compartilham duas características cariotípicas singulares, o maior tamanho do primeiro par metacêntrico e a presença de cromossomos acrocêntricos em G e E, aqui sugere-se que o citótipo F homomórfico e o G com sistema múltiplo (XX/X<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>) podem ter derivado de uma forma ancestral semelhante ao citótipo E (Bertollo *et al.*, 2000; Cioffi *et al.*, 2009).

**Tabela 2:** Número diplóide, sistema sexual e distribuição geográfica de alguns exemplares de *H. malabaricus* (BERTOLLO *et al.*, 2000).

CITÓTIPO	NÚMERO DIPLÓIDE	SISTEMA SEXUAL	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
Citótipo A	2n=42	Indeterminado	Norte ao Sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina
Citótipo B	2n=42	XX/XY	Sistema de lagos do Vale do Rio Doce - MG
Citótipo C	2n=40	Indeterminado	Norte do Brasil e noroeste da Argentina
Citótipo D	Machos: 2n=39 Fêmeas: 2n=40	Machos: X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y Fêmeas: X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	Norte do Paraná
Citótipo E	2n=42	Indeterminado	Rio Trombetas - PA
Citótipo F	2n=40	Indeterminado	Suriname ao sudoeste do Brasil, preferencialmente na parte oriental do continente
Citótipo G	Fêmeas: 2n=40 Machos: 2n=41	Fêmeas: XX Machos: XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	Restrito a alguns locais na Amazônia

Segundo Prioli *et al.* (2000), a emergência de citótipos em *H. malabaricus* poderia resultar, pelo menos parcialmente, do hábito sedentário e da baixa intensidade de migração, características dessa espécie; tais atributos poderiam

induzir a formação de populações locais ou subpopulações com pouca conexão e consequente baixo fluxo gênico, como decorrência de isolamento - por - distância.

Apesar da classificação em citótipos ter grande utilidade prática, deve-se levar em consideração que o reconhecimento de formas cariotípicas distintas evidenciadas por variados marcadores citogenéticos pouco tem contribuído para a resolução de problemas taxonômicos do grupo, além disso, a ampliação das áreas de coleta/estudo revela que a diversidade citogenética de *H. malabaricus* é maior do que previamente estimado e revela variantes até mesmo entre populações de um único citótipo, é o caso do citótipo A, que apresenta diferentes fórmulas cariotípicas e padrões de bandeamento C e NOR que variam de acordo com a procedência dos espécimes (VICARI *et al*, 2005; BLANCO *et al*, 2010).

Essa ampla variação genética intraespecífica em *H. malabaricus* tem despertado forte interesse no campo da biologia evolutiva, porém ainda são escassos os trabalhos que abordam este assunto utilizando marcadores moleculares. Com o uso de marcadores RAPD, Dergam *et al.* (1998) analisaram a estrutura genética de populações da bacia do rio Paraná e encontraram forte diferenciação genética dentro e entre as populações dos rios Paraná e Tibagi.

Um resultado semelhante utilizando o mesmo marcador em traíras da bacia do Rio Doce - MG também foi descrito no trabalho de Dergam *et al.* (2002), neste trabalho foi possível verificar uma clara distinção de espécimes de *Hoplias malabaricus* entre populações litorâneas e costeiras; esse resultado foi associado a pressões seletivas, eventos vicariantes históricos e processos não seletivos como deriva genética e eventos fundadores; nesse mesmo trabalho foram realizados estudos do mtDNA (RNA 16S) e foi possível diferenciar os espécimes em dois grupos bem definidos indicando uma possível distinção de duas espécies crípticas, suportado pelos altos valores de *Bootstrap*.

Estudos genéticos em *Hoplias spp.* da bacia amazônica são raros. Vittone (2008) analisou uma pequena amostra (21 exemplares) utilizando o marcador mitocondrial RNA16S, embora tenha se verificado uma baixa variação nucleotídica intraespecífica, a divergência interespecífica alcançou o máximo de 2,7% e permitiu a diferenciação de dois clados, um formado por amostras do Rio Itapecuru – MA e outro formado por amostras de Monte Alegre e Ilha do Marajó – PA.

Em síntese, a fixação de várias mudanças cromossômicas e moleculares gerando diversificação dentro desta espécie apóia a hipótese de que o táxon

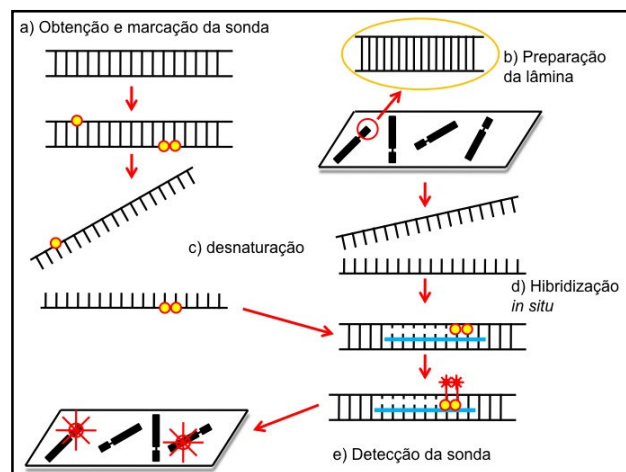
nominal *Hoplias malabaricus* é composto de várias unidades biológicas independentes, ou seja, um complexo de espécies crípticas (DERGAM *et al*, 1998; BERTOLLO *et al*, 2000; BORN e BERTOLLO, 2000; 2001).

## 1.4 FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE

### 1.4.1 Marcadores citogenéticos

Os estudos populacionais de análise citogenética podem ser divididos em dois níveis de abordagem: O primeiro que envolve o estudo do número e morfologia dos cromossomos, de identificação de regiões marcadoras como descrição de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) e localização de heterocromatina constitutiva e um segundo nível que envolve alta resolução de bandas cromossômicas e técnicas de citogenética molecular (ALMEIDA TOLEDO, 1998).

As técnicas de hibridização *in situ* utilizando corantes fluorescentes (FISH) e bandeamentos cromossômicos clássicos tem fornecido contribuições importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos (GALETTI *et al*, 1998). A FISH consiste no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar situada no próprio cromossomo, visando verificar a localização cromossômica *in situ* dos segmentos alvos nos diferentes cariótipos analisados, Figura 2 (GUERRA, 2004).



**Figura 2:** Etapas da metodologia de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), adaptada de Guerra (2004).

Outros marcadores cromossômicos estão sendo usados em estudos citogenéticos como os fluorocromos base-específicos que são úteis para a caracterização das regiões ricas em AT ou GC e podem ser divididos em duas classes: os AT específicos como o DAPI e os GC específicos, como a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e a Mitramicina (MM). Em alguns peixes, fluorocromos GC específicos apresentam uma notável relação com as NORs independentemente do estado de atividade da região, devido ao fato da provável ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre sequências de DNA repetitivos adjacentes (SALVATORI *et al*, 1995).

Os fluorocromos e a FISH não são utilizados apenas na identificação das NORs, estes muitas vezes podem ser empregados na caracterização de regiões heterocromáticas, um bom exemplo consiste no estudo feito com a espécie *Astyanax jajeiroensis* (EIGENMANN, 1908) realizado por Vicari *et al.*(2008). Neste estudo, no mínimo três classes de heterocromatina foram identificados no genoma: (1) a heterocromatina centromérica/ teloméricas, (2) 18S + GC +heterocromatina associada com vários sítios de NORs e (3) As 51 + 18S + DAPI que atenuou a heterocromatina. A sonda “As 51” foi desenvolvida a partir de DNA satélite da espécie de peixe *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842), esta sonda é caracterizada por 51 pares de bases (As 51) localizada na região de heterocromatina distal de alguns cromossomos acrocêntricos (MESTRINER *et al*, 2000).

Em populações de peixes de água doce, a ocorrência de espécies crípticas tem sido detectada através da análise cariotípica. Nesse caso, é possível observar variações intraespecíficas quanto ao número diplóide, fórmula cariotípica, padrão de distribuição da heterocromatina e localização de sítios ribossômicos (FRANKHAM *et al*, 2008).

#### **1.4.2 Código de barras do DNA (DNA *barcode*)**

Os métodos moleculares de análise genética são muito utilizados para as mais diversas funções, diferentemente da citogenética animal, essa técnica não requer que o espécime esteja vivo para a aquisição de um bom material de estudo, o que permite ao pesquisador uma maior comodidade podendo coletar fragmentos de

tecidos nos mercados locais e também possibilita o estudo das relações genéticas de táxons extintos e ameaçados de extinção, pelo aproveitamento de amostras obtidas de espécimes antigos preservados em Coleções Científicas.

O método de Código de Barras do DNA (DNA *Barcode*) visa a discriminação das entidades biológicas (espécies) através da análise da variabilidade de um ou mais marcadores moleculares padronizados para se estimar e determinar os níveis de variação intra- e interespecíficas (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007; CASIRAGHI *et al.*, 2010).

O princípio que embasa a metodologia de DNA *barcode* é semelhante ao código de barras de sequência numérica utilizada para identificar individualmente produtos do mercado varejista. No caso do DNA *Barcode*, as variáveis são as bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) em diferentes posições e também cadeias de sítios mais longos. Segundo Hebert *et al.* (2003), principal defensor do DNA barcoding, o potencial de identificação molecular por este método é enorme e teoricamente, uma sequência de apenas 15 sítios nucleotídicos poderia gerar cerca de um bilhão de combinações únicas, ou seja códigos únicos semelhantes aos códigos de barras; número este que é maior do que o número de espécies conhecidas que somam cerca de 15 milhões.

As idéias originais sobre o uso de marcadores moleculares para a identificação de espécies biológicas datam da década de 70 do século passado. Hebert *et al.* (2004a) citam que Carl Woese foi o primeiro a aplicar o estudo de diferenças em sequências nucleotídicas em um único gene a fim de investigar as relações evolucionárias entre indivíduos (WOESE e FOX, 1977).

Para que a região de um gene seja utilizada como um código de barras, ela precisa obrigatoriamente preencher três critérios: (1) Expressar de forma significativa a variabilidade entre as espécies, (2) Ser curta para ser sequenciada em apenas uma única reação, (3) Conter uma região conservada para a utilização de *primers* universais. Observando estes critérios, Hebert *et al.* (2003) propuseram a padronização de uma sequência de aproximadamente 650pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (*cox I*) para a identificação de táxons animais a nível de espécie e ser utilizada no descobrimento de novas espécies.

O DNA Barcoding se popularizou a partir de 2004 com a criação do "*Consortium for the Barcode of Life*" (CBOL - [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)) que visa servir como um banco de sequências de todas as espécies. No processo de validação de



seqüências *Barcode* outros dados também são associados às amostras, tais como: Fotos do espécime (*Voucher*); Informações de campo, como ponto de coleta, coletor e data; número do espécime e instituição na qual esse material foi depositado; dados taxonômicos; Informações moleculares como os eletroferogramas das sequências e quais *primers* foram utilizados na amplificação/seqüenciamento (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

Os bancos de dados de DNA *Barcode* são predominantemente compostos de pequenas sequências de DNA de alguns indivíduos, geralmente entre 5 a 10 indivíduos, e de um grande número de espécies. Entretanto, acredita-se que esses números irão aumentar consideravelmente com o tempo (HAJIBABAEI *et al*, 2007).

Por serem sequências curtas, o DNA Barcode é limitado para a resolução dos ramos de profundidade em filogenias (BLAXTER, 2004). Por outro lado, Seberg *et al.* (2003), defende a conservação das sequências alvo onde em geral o alinhamento não é problemático e que as dificuldades maiores encontradas se dão quando uma espécie completamente nova é descoberta, mas este é apenas um estímulo para uma análise mais aprofundada, em vez de uma falha fatal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade genética do complexo *Hoplias malabaricus* na região do Baixo Amazonas por meio de marcadores citogenéticos e moleculares (DNA *Barcode*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os citótipos do complexo *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas;

Identificar as Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) nos diferentes citótipos;

Descrever o padrão de bandeamento C nos diferentes citótipos;

Mapear cromossomicamente as regiões de rDNA 18S nos diferentes citótipos;

Comparar os padrões de marcação por Cromomicina A<sub>3</sub> nos diferentes citótipos;

Estimar a divergência intra e interespecífica entre os citótipos encontrados;

Estimar a diversidade de haplótipos na presente amostra;

Depositar no BOLD (*Barcoding of Life Data Systems*) sequências DNA *barcode* de *Hoplias malabaricus* da bacia amazônica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

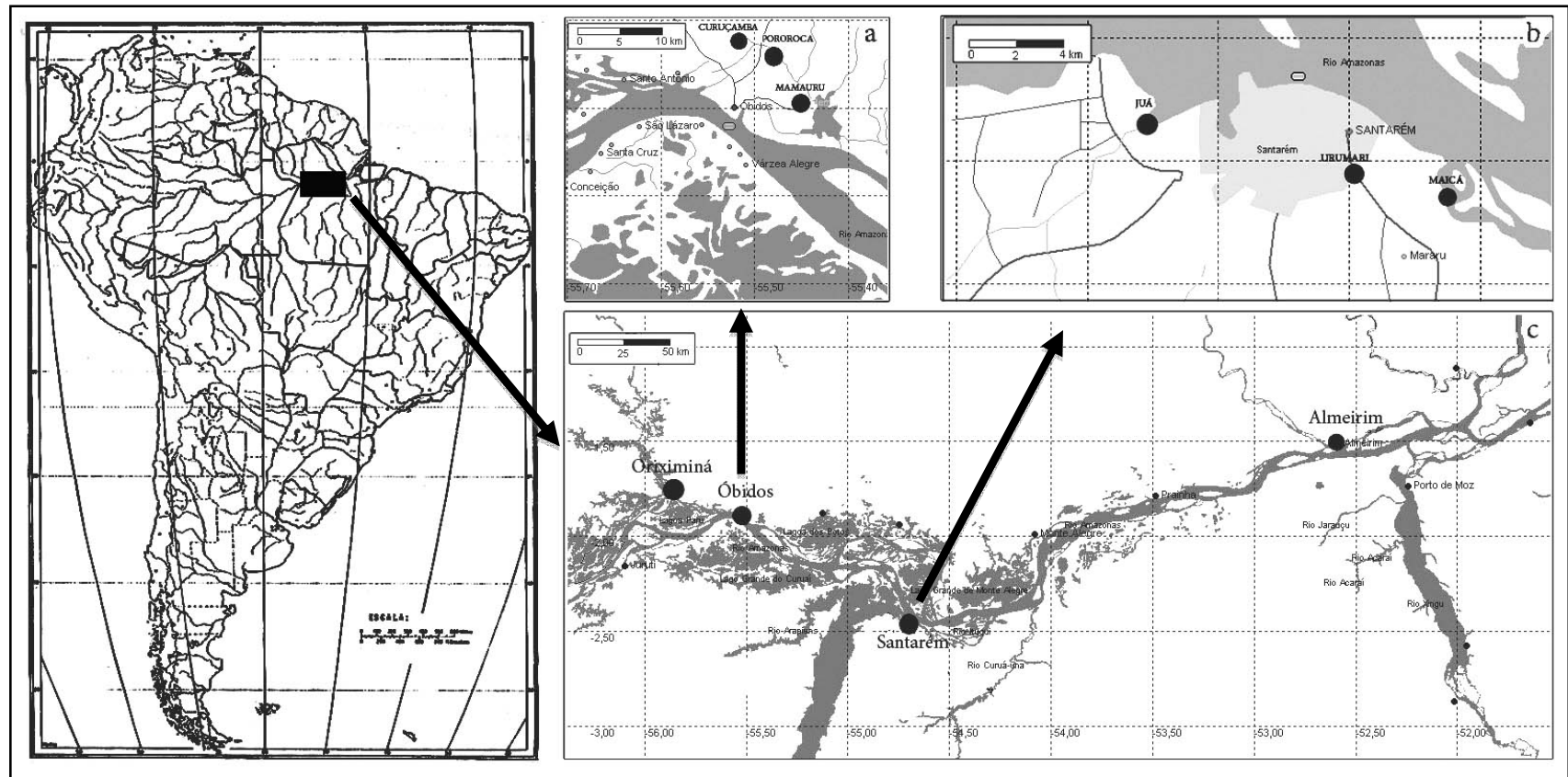
#### 3.1 COLETAS E CARACTERIZAÇÕES DAS AMOSTRAS

Foram coletados 59 espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes de oito localidades da bacia amazônica, região do Baixo Amazonas (Tabela 3, Figura 3). As coletas foram realizadas com auxílio de pescadores locais e os espécimes foram mantidos em tanques aerados e submetidos aos procedimentos de obtenção cromossômica. Quando o local de coleta era situado nas proximidades de Santarém, os procedimentos eram realizados no Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), caso contrário, eram feitos em bases de apoio em campo. De cada exemplar, foi obtida uma amostra de tecido do músculo cardíaco, que foi preservada em etanol 100% a -20° C.

Os espécimes foram identificados com auxílio de chave dicotômica (OYAKAWA e MATTOX, 2009) e posteriormente fixados por 48 horas em Formol diluído a 10% e transferidos para etanol a 70%. Os exemplares encontram-se depositados na Coleção de Vertebrados do Museu de Zoologia da UFOPA.

**Tabela 3:** Caracterização da amostra de *Hoplias malabaricus* proveniente da região do Baixo Amazonas-PA. (?) sexo não identificado, (+) cariótipo ou DNA Barcode obtido, (-) cariótipo ou DNA Barcode não obtido.

	Local de Coleta	Nº de Campo	Sexo	Cariótipo	DNA Barcode ( <i>cox I</i> )
n=12	1) Lago Maicá, Santarém, PA S 02° 27' 30,3" W 054° 40' 13,2"	MAI - 2	♀	+	+
		MAI - 3	♀	+	+
		MAI - 4	♀	+	+
		MAI - 12	?	-	+
		MAI - 16	♀	+	+
		MAI - 21	♀	+	+
		MAI - 26	♀	+	+
		MAI - 34	♀	+	-
		MAI - 36	♀	+	-
		MAI - 37	♀	+	-
		MAI - 38	♀	+	+
		MAI - 39	♀	-	+
n=12	2) Rio Amazonas, Almeirim, PA S 1° 31' 3,7" W 52° 28' 22,7"	ALM - 1	♀	-	+
		ALM - 2	♀	+	+
		ALM - 3	♀	-	+
		ALM - 4	♀	-	+
		ALM - 5	♀	+	+
		ALM - 6	♀	+	ALM
		ALM - 7	♀	-	+
		ALM - 8	♀	+	-
		ALM - 9	♀	+	+
		ALM - 10	♀	+	+
		ALM - 11	♀	+	+
		ALM - 12	♀	+	+
n=6	3) Igarapé Pororoca, Óbidos, PA S 01° 50' 48,8" W 55° 27' 15,7"	OBI - 1	?	+	+
		OBI - 2	?	+	+
		OBI - 11	?	+	+
		OBI - 12	?	+	+
		OBI - 14	♀	+	+
		OBI - 15	♀	+	+
n=2	4) Igarapé Curuçambá, Óbidos, PA n=2 S 01° 50' 01,3" W 55° 29' 27,0"	OBI - 4	?	+	+
		OBI - 10	♀	+	+
n=4	5) Igarapé Mampurú, Óbidos, PA S 01° 54' 58,2" W 55° 26' 20,5"	OBI - 17	♀	+	+
		OBI - 18	♀	+	+
		OBI - 19	♀	+	+
		OBI - 20	♀	+	+
n=7	6) Lago Sapucúá, Oriximiná, PA S 01° 47' 116" W 055° 59' 34,6"	ORX - 1	♀	+	+
		ORX - 3	♀	+	+
		ORX - 4	♀	+	+
		ORX - 5	♀	+	+
		ORX - 7	♀	+	+
		ORX - 12	♀	+	-
		ORX - 17	♀	+	+
n=8	7) Lago Juá, Santarém, PA S 02° 26' 40,0" W 054° 47' 21,1"	JUA - 1	?	+	+
		JUA - 2	?	+	+
		JUA - 3	?	+	+
		JUA - 9	♀	+	+
		JUA - 11	♀	+	+
		JUA - 13	♀	+	+
		JUA - 14	♀	+	+
JUA - 15	♀	+	+		
n=8	8) Igarapé Urumari, Santarém, PA S 02° 27' 28,4" W 054° 41' 53,9	STM - 42	♀	+	+
		STM - 47	♀	+	+
		STM - 48	♀	+	+
		STM - 54	♀	+	+
		STM - 55	♀	+	+
		STM - 61	♀	+	+
		STM - 63	♀	+	+
		URU - 8	♀	+	+



**Figura 3:** Mapa das localidades de coleta amostradas no presente estudo. (a) Pontos do município de Óbidos; (b) Pontos do município de Santarém e (c) Região do Baixo Amazonas (PA) no trecho de Óbidos a Almeirim.

## 3.2 MÉTODOS CITOGENÉTICOS

### 3.2.1 Preparação cromossômica e análise do cariótipo

Para o estudo citogenético dos exemplares coletados, utilizou-se a técnica de preparação cromossômica direta a partir de células do rim cefálico, conforme descrita por Bertollo (1978). Os peixes foram inicialmente tratados com uma solução aquosa de Colchicina a 0.025% na dosagem de 1mL por 100g de massa corpórea. A injeção foi aplicada na região ventral do peixe e o mesmo era mantido em tanque areado por 40 a 50 minutos. Decorrido este tempo os exemplares foram anestesiados e eutanasiados com a adição de óleo de cravo (Eugenol) na água do tanque, seguindo-se a proporção aproximada de 5mL de Eugenol para 10L de água do tanque. O Eugenol foi preparado na proporção de 10mL de óleo de cravo para 200mL de Etanol puro.

O tecido renal foi removido e macerado em solução hipotônica de Cloreto de Potássio a 5,6g/L, previamente aquecida a 37°C. A suspensão celular foi transferida para tubo de centrífuga e incubada a 37°C por 20 minutos. Em seguida, acrescentou-se no tubo 1mL de fixador Metanol-Ácido acético (3:1v/v) recém preparado e gelado. A suspensão celular foi homogeneizada com pipeta Pasteur e centrifugada a 1000 rotações por minuto (rpm) por dez minutos. Após a sedimentação do *pellet* celular, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 5 a 10mL de fixador. Novamente a suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada conforme descrito acima. O processo de fixação repetiu-se por três vezes e após a última troca de fixador acrescentou-se um volume deste suficiente para diluir a suspensão celular e promover um bom espalhamento de células sobre a lâmina. Ao final da preparação os tubos foram estocados em freezer a -20°C até o momento da preparação de lâminas. As quais foram previamente imersas em solução sulfocrômica por cerca de uma semana, depois lavadas com detergente neutro e estocadas em álcool etílico na geladeira.

Em cada lâmina foram gotejados 10 a 20µl da preparação cromossômica e as lâminas foram colocadas em uma superfície metálica dentro de um banho-maria a 50°C por 30 segundos para a evaporação do fixador e completo espalhamento do

material celular sobre a lâmina. Para a visualização dos cromossomos e análise do cariótipo, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato na proporção de 1:14 v/v durante dez minutos.

Em seguida, essas lâminas foram levadas ao microscópio no qual, para cada material celular utilizado, foram analisadas 30 células ou mais, dependendo da variação do número de cromossomos espalhados de cada célula; as metáfases que apresentaram uma melhor dispersão dos cromossomos e com melhor morfologia destes, foram fotografadas em microscópio Zeiss Axioskop40 com câmera Canon A640-10MP (fotografia digital), ou em microscópio Olympus BX41 (fotografia convencional em negativo). Os filmes foram processados em reveladores Kodak Dektol e D-76 e as imagens ampliadas em papel Kodak.

Uma vez obtidas as imagens cromossômicas, seguiu-se então para a próxima etapa, na qual as fotos sofreram ajustes iniciais de brilho e contraste, recorte e montagem do cariótipo. Essas tarefas foram realizadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0. Os cromossomos foram classificados em Metacêntricos, Submetacêntricos e Acrocêntricos segundo Levan *et al.* (1964). No cariótipo convencional foi observado o número diplóide, o número fundamental e a fórmula cariotípica.

### **3.2.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva**

Para a caracterização do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandeamento C descrita por Sumner (1972) com algumas modificações. As lâminas foram imersas em Ácido Clorídrico (HCl) 0,2 N à temperatura ambiente entre sete a dez minutos. Em seguida foram lavadas com água destilada e deixadas para secar. Depois de secas, as lâminas foram imersas por 1 a 2 minutos em solução aquosa de Hidróxido de Bário ( $Ba(OH)_2$ ) a 5%, filtrada e pré-aquecida em banho-maria a 45°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em HCl 0,1N a temperatura ambiente e depois em água destilada. Logo em seguida, foram incubadas em solução salina de 2xSSC a 60°C entre 40 a 60 minutos. Depois de lavadas com água destilada e secadas ao ar; as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 40 a 60 minutos.

### 3.2.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) por Nitrato de Prata e FISH

As NORs foram evidenciadas por impregnação do Nitrato de Prata (Howell & Black, 1980) e por hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

No primeiro método, as lâminas foram previamente hidrolisadas em HCl 0,2N à temperatura ambiente por 7 minutos, lavadas com água destilada e secas ao ar. Em seguida o material foi gotejado sobre a lâmina seca uma gota de solução coloidal de gelatina incolor a 2% acrescida de Ácido Fórmico na concentração de 1% e duas gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 50% recém preparada e filtrada. As lâminas foram recobertas com lamínula, invertidas e colocadas sobre um suporte dentro de uma câmara úmida. O experimento foi então incubado em banho-maria a 60°C por cerca de 5 minutos. Quando a preparação adquiria uma coloração marrom-dourada, as lâminas foram lavadas com água destilada. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por aproximadamente dois minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas para secar.

No método de FISH utilizou-se um protocolo adaptado de Pinkel *et al.* (1986). As sondas de rDNA 18S, utilizadas para detecção da NOR, foram preparadas a partir do DNA genômico de *H. malabaricus*, extraído segundo o protocolo padronizado de Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O fragmento do gene ribossomal 18S foi isolado via PCR usando-se os *primers* F 5'-CCGCTTTGGTGA CTCTTGAT-3' e R 5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3' desenhados a partir da seqüência completa do gene rDNA 18S de *Ictalurus punctatus* disponível nos bancos de dados do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (código identificador da seqüência AF021880). O produto da PCR amplificado foi visualizado em gel de agarose a 0,8%.

As sondas foram marcadas com Biotina-14-dATP pelo método de *Nick translation*, utilizando o kit BioNick<sup>TM</sup> (Invitrogen), seguindo as instruções do



fabricante. A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram obtidas usando-se FITC-avidina e FITC-anti-avidina respectivamente. As metáfases foram contrastadas com contra-corante Iodeto de Propídio e montadas com o *anti-fadingVectashield*. Estes experimentos foram realizados no LGBIO em Santarém e as lâminas foram fotografadas no laboratório de Citogenética Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus. Experimentos semelhantes utilizando sondas marcadas FITC e contracoradas com DAPI foram conduzidos no Lab. de Citogenética da UFPA em Belém.

### **3.2.4 Detecção de sítios ricos em GC pelo fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>**

A marcação com Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) foi realizada conforme o protocolo de Schweizer(1976) com algumas modificações sugeridas por Donlon e Magenis (1983). Sobre a lâmina envelhecida por dois dias foi colocado 20µl de CMA<sub>3</sub>, depois foi coberta com uma lamínula plástica e incubada numa câmara escura mantida a temperatura ambiente por 30 minutos. Foi retirada a lamínula e lavada a lâmina com tampão McIlvaine, pH=5,6 e deixada para secar ao ar. Em seguida a lâmina era mergulhada em uma solução de Verde Metil por 15 minutos. Logo após, a lâmina era lavada com tampão McIlvaine, pH=5,6 e seca ao ar. Sobre a lâmina era colocado 15µl de *anti-fading*, uma solução composta por 50% de glicerol e 50% de tampão McIlvaine pH=5,6 e depois era coberta com uma lamínula de vidro, em seguida era armazenada em uma câmara escura por cerca de 3 dias em temperatura de 4°C para estabilização do fluorocromo.

### 3.3 MÉTODOS MOLECULARES

#### 3.3.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico, foi isolado pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al*, 1989), com modificações. Inicialmente um pequeno fragmento de tecido do músculo cardíaco foi separado em um microtubo de 1,5mL, em seguida este foi homogeneizado na solução tampão de lise, acrescida de 10µL da enzima RNase 10mg/mL, sendo levado ao banho-maria a 37°C por 60 minutos, após esse tempo, na solução foi acrescentado 10µL de Proteinase K 10mg/mL, nessa etapa, a temperatura do banho Maria foi elevada a 55°C permanecendo por três horas ou *overnight* para algumas amostras.

Após a completa digestão do tecido o material sofreu sucessivas lavagens com 700µL de fenol-clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), nessa etapa o material foi homogeneizado manualmente por 20 minutos e centrifugado por dez minutos a 10.000 rpm, para a separação das impurezas.

O sobrenadante do tubo foi transferido para um tubo novo contendo 700µL de clorofórmio e álcool isoamil (24:1), o tubo foi novamente homogeneizado por 20 minutos, sendo centrifugado em seguida por dez minutos a 10.000 rpm para uma outra separação das fases do material e retirada do sobrenadante.

Para a precipitação do DNA foi adicionado 100µL de Acetato de Sódio (AcNa 3M, pH 4,8) e 100µL de isopropanol gelado. O material foi agitado suavemente, nessa etapa, quando a nuvem de DNA era visualizada, o protocolo seguiu-se normalmente, caso contrário, o material seria armazenado em *freezer* – 20°C por no mínimo uma hora. Já para as etapas finais do trabalho, o tubo foi centrifugado por dez minutos a 10.000 rpm, descartou-se o sobrenadante com cuidado para não perder o *pellet* nesse processo, o DNA sofreu lavagem pela adição de 200 µL de etanol a 70% e centrifugado, após o descarte do álcool, o tubo foi levado à estufa a 37°C por cerca de 20 minutos até que houvesse a total evaporação e eliminação do resíduo deste. Após a extração o DNA foi eluído em 20 a 50µl de água bidestilada estéril e visualizado em gel de Agarose 1%.

### 3.3.2 Isolamento e amplificação do gene *cox I* (DNA barcode)

Um fragmento de 651 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (*cox I*) foi isolado e amplificado via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) usando-se o coquetel de *primers* denominado **C\_FishF1t1–C\_FishR1t1** (posição 6475–7126) descritos por Ivanova *et al.* (2007) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Caracterização do coquetel de *primers* utilizados para o isolamento do gene *cox I*, segundo Ivanova *et al.* (2007). Sequência da cauda M13 destacada em cinza.

Nome	Sequência do <i>primer</i> 5'→3'	Posição do <i>primer</i>	Referência
VF2_t1	TGTAACGACGGCCAGT	6448–6474	*Ward <i>et al.</i> 2005
FishF2_t1	TGTAACGACGGCCAGT	6448–6474	*Ward <i>et al.</i> 2005
FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	7152–7127	*Ward <i>et al.</i> 2005
FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	7152–7127	Ivanova <i>et al.</i> 2007
M13F (-21)	TGTAACGACGGCCAGT		Messing (1983)
M13R (-27)	CAGGAAACAGCTATGAC		Messing (1983)

\**Primer* originais modificados.

Inicialmente, para composição do produto da PCR foi adicionado a um tubo de 0,2mL, 15,9 µL de água de injeção; 4µL de DNTP (1,25 mM); 2,5µL de solução tampão (200 mM Tris-HCl (pH8,4) + 500 mM KCl); 1µL de Cloreto de Magnésio (50 mM); 1 µL de DNA; 0,2 µL do coquetel de *primer forward* (200 ng/µL); 0,2 µL do coquetel de *primer reverse* (200ng/µL) e 0,2 µL da enzima Taq polimerase (5U/µL).

A programação do termociclador foi orientada conforme os passos descritos adiante: Houve uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos com três etapas: Desnaturação a 94°C durante 30 segundos; hibridização a 59°C por um minuto e síntese de fragmentos ou extensão a 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por sete minutos. Ao final da amplificação os fragmentos de COI foram examinados em gel de Agarose 1%, o DNA foi contrastado com Gelred (Uniscience) na proporção 1:1 v/v do DNA e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador.

### 3.3.3 Purificação e Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com o kit enzimático exonuclease Exosap-IT (GE Healthcare) seguindo-se as instruções do fabricante: inicialmente foi transferido 2,5µL de produto de PCR em um tubo 0,2mL em seguida foi adicionado 1µL de Exosap-IT, o material foi homogeneizado em vórtex (velocidade rápida) e incubado no termociclador a 37°C por 15 minutos; a enzima foi inativada a 80°C por 15 minutos; em seguida o produto foi misturado e pronto para a reação de sequenciamento.

Para a reação de sequencia seguiu-se o método didesoxiterminal de Sanger utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e *primer* M13, o programa utilizado no termociclador foi realizado da seguinte forma: inicialmente a placa foi submetida à temperatura de 96°C por um minuto para desnaturação inicial, em seguida foram realizados 35 ciclos de alterações de temperatura no seguinte estágio, 96°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos para o anelamento do *primer* e extensão do fragmento a 60°C por quatro minutos; nessa reação não é necessário ter o processo de extensão final comum no processo de reação de produtos e PCR.

Ao final da reação de sequência as amostras foram submetidas à precipitação e lavagem para retirada de reagentes não incorporados aos fragmentos de DNA gerados. Inicialmente foi adicionado 2,5 µL de EDTA (1,25 mM) em cada amostra seguido de uma centrifugação rápida. Foi adicionado 30 µL de etanol 100%, a placa foi fechada para a homogeneização manual de forma suave por quatro vezes.

A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi feita a centrifugação 3.000 rpm por 30 minutos; a placa foi Invertida para uma breve centrifugação à 185 rpm por 15 segundos, foi adicionado 30µL etanol 70% seguida de centrifugação 2.000 rpm por 15 minutos, descarte dos reagentes por inversão, breve centrifugação com a placa invertida a 185 rpm por 1 minuto, secagem na estufa. Momentos antes da eletroforese de sequenciamento na placa contendo as reações de sequência, os possos foram ressuspensos com 10µL de Formamida - corante em seguida aquecida a 94°C por três minutos para desnaturação do DNA e colocados imediatamente em gelo.

A eletroforese para leitura das sequências de DNA foi feita no Sequenciador Automático de ABI 3500 XL E ABI 3500 (Applied Biosystems). Tendo uma duração de cerca de 8 horas para o sequenciamento total.

### 3.3.4 Análise das sequências de DNA Barcode

As sequências nucleotídicas obtidas do Analizador Automático de DNA foram alinhadas automaticamente com o uso do aplicativo Clustal W (THOMPSON *et al*, 1994) implementado no programa BioEdit versão 7.0.5.3 (HALL, 1999) seguida de inspeção e edição manual. A verificação de códons de parada foi inspecionada com auxílio do programa DAMBE versão 4.2.13 (XIA e XIE, 2001). Para confirmação do gene *cox I*, algumas sequências geradas neste trabalho foram confrontadas com o banco de sequências nucleotídicas do *Genbank* (*National Center for Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1997) e também confrontadas com o banco de sequências DNA *Barcode* na plataforma BOLD (*Barcoding of Life Database* - <http://www.boldsystems.org/views/login.php>) (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

A composição nucleotídica do banco de dados, assim como a análise de distância intraespecífica e o padrão de agrupamentos utilizando-se o algoritmo Neighbour-Joining (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) sob o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), sem a adição de grupos externos foi efetuada na plataforma BOLD, utilizando-se as ferramentas *Sequence composition*, *Distance summary* e *Taxon ID Tree*. Análise da diversidade e compartilhamento de haplótipos foi realizada com auxílio dos programas DNAsp 5.10.01 (ROZAS *et al*, 2003), NETWORK 4.6.0 (BANDELT *et al*, 1999).

Uma segunda análise de agrupamento foi realizada no programa MEGA (TAMURA *et al*, 2007), utilizando-se os mesmos métodos citados acima (NJ e K2P), porém, acrescentando-se ao banco de dados sequências de grupo externo obtidas da plataforma BOLD (*Rhamdia guatemalensis*: MEFM655-06|MX655, MEFM474-06|MX243; *Hepsetus odoe*: BAFEN323-10|BNF 323, BAFEN324-10|BNF 324). O suporte estatístico dos grupos foi estimado com teste *Bootstrap* com 1.000 pseudoréplicas do banco de dados.

Considerando-se que o táxon nominal *Hoplias malabaricus* pode representar um complexo de espécies (DERGAM *et al*, 1998; BERTOLLO *et al*, 2000; BORN e BERTOLLO, 2000; 2001), uma vez evidenciados grupos apoiados por análise da divergência nucleotídica e agrupamento de vizinhos, os mesmos passaram a ser tratados como espécies potenciais e repetiu-se as análises comparativas de divergência intra e interespecífica. Além disso, com base na informação cariotípica foram estabelecidos grupos “*a priori*” com cariótipos distintos para se verificar se a divergência cariotípica assemelha-se ao padrão encontrado de divergência molecular e se poderia ser útil como um marcador taxonômico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Foram analisados os cariótipos de 53 indivíduos de *Hoplias malabaricus* provenientes da região do Baixo Amazonas, no estado do Pará. Na presente amostra foram observados quatro padrões cariotípicos distintos com relação ao número diplóide, os quais foram classificados nos citótipos A ( $2n=42; 22 M + 20 SM$ ); C ( $2n=40; 20 M + 20 SM$ ), G ( $2n=41; 21 M + 19 SM + 1A$ ) e E ( $2n=42; 20 M + 20 SM + 2 A$ ), seguindo-se a nomenclatura proposta por Bertollo *et al.* (2000), Tabela 5.

**Tabela 5:** Caracterização citogenética de citótipos do complexo *Hoplias malabaricus* provenientes da região do Baixo Amazonas-PA. ( $2n$ ) número diplóide, (NF) número fundamental, (-) sistema sexual não evidenciado, (N) número de indivíduos.

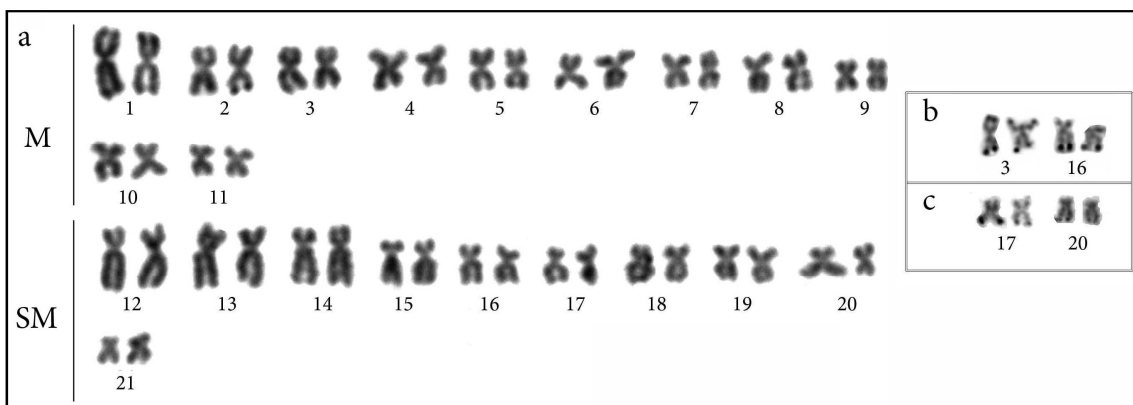
Citótipo	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Sistema sexual	N	Localidades
A	42	22 M + 20 SM	84	-	9	4, 7, 8
C	40	20 M + 20 SM	80	-	46	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
G	41	20 M + 20 SM + 2 A	76	XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	3	8
E	42	20 M + 20 SM + 1 A	82	-	1	8

**Localidades:** **1)** Lago Maicá, Santarém; **2)** Rio Amazonas, Almeirim; **3)** Igarapé Pororoca, Óbidos; **4)** Igarapé Curuçambá, Óbidos; **5)** Igarapé Mamaurú, Óbidos; **6)** Lago Sapucuá, Oriximiná; **7)** Lago Juá, Santarém; **8)** Igarapé Urumari, Santarém.

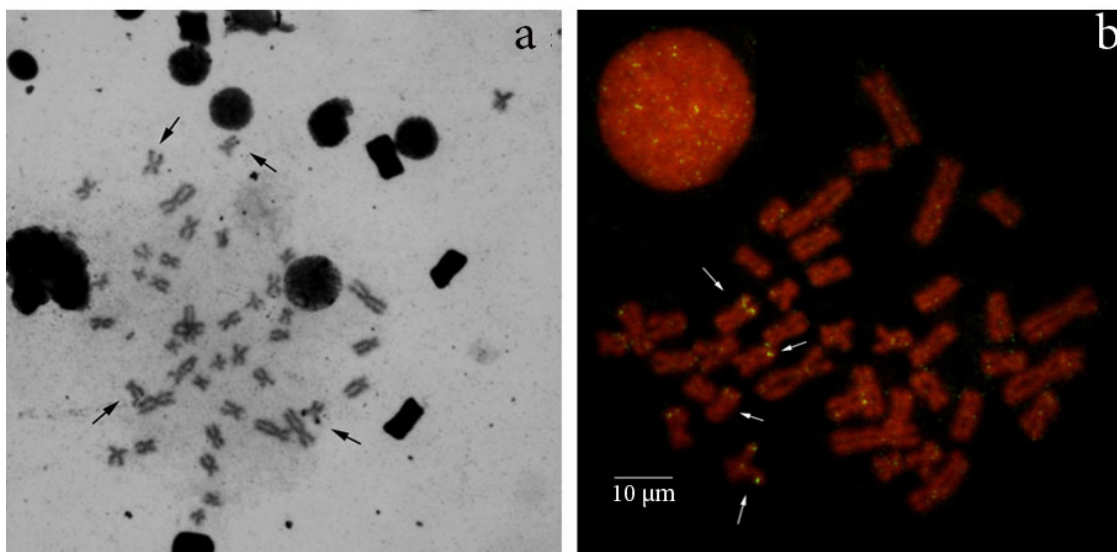
## CITÓTIPO A

O citótipo A ( $2n=42$ ) foi observado em sete amostras provenientes do Lago do Juá e Igarapé Urumari (Santarém-PA) e Igarapé Curuçambá (Óbidos-PA). A macroestrutura do cariótipo é a mesma em todas as localidades, mantendo-se a fórmula cariotípica ( $22 M + 20 SM$ ) (Figura 4a).

Os sítios nucleolares impregnados com nitrato de prata, foram evidenciado nos pares 3 e 16, o primeiro par possui marcação bitelomérica e o segundo apenas na região terminal do braço longo (Figura 4b). As amostras provenientes do município de Óbidos apresentaram marcação de NOR nos pares 17 e 20 na região terminal do braço longo (Figuras 4c, 5a). Um experimento de FISH com sondas rDNA 18S foi executado em uma amostra de Óbidos (OBI-10) e demonstrou 4 sítios positivos para fluorescência em posição semelhante ao detectado pelo Nitrato de Prata, provavelmente nos pares 17 e 20 (Figura 5b)

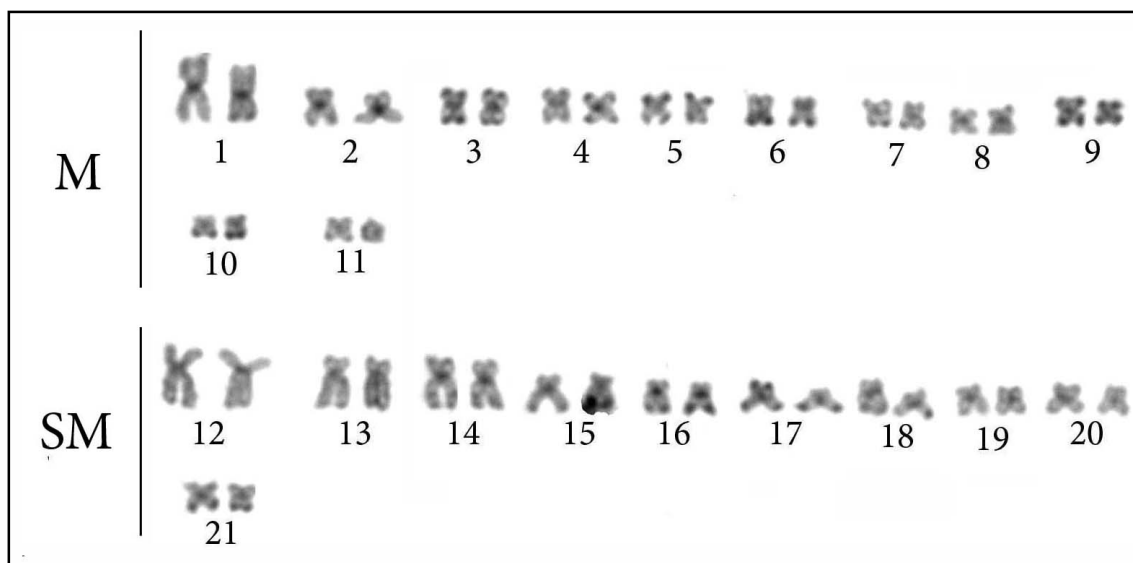


**Figura 4:** (a) Cariótipo em coloração convencional do espécime STM – 42 (citótipo A); (b) Região organizadora de nucléolo em STM – 42; (c) Região organizadora de nucléolo em OBI – 10.



**Figura 5:** (a) Coloração com nitrato de prata; (b) marcação dos sítios 18S do espécime OBI – 10.

Regiões de heterocromatina constitutiva foram evidenciadas pelo bandeamento C preferencialmente em posição centromérica de todos os cromossomos, em pequena quantidade. Os pares 3 e 9 também apresentaram bandas C na posição distal de ambos os braços cromossômicos, enquanto que, os pares 5, 6, 10, 16 e 17 mostram banda C distal em apenas um dos braços (Figura 6).

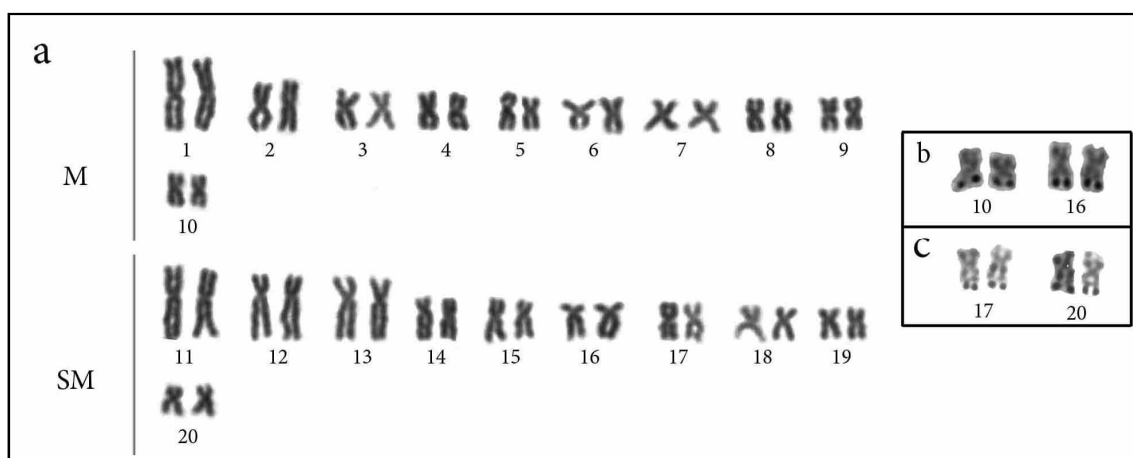


**Figura 6:** Padrão de bandeamento C no espécime OBI – 4 (citótipo A).



## CITÓTIPO C

O citótipo C foi o que apresentou maior representatividade na presente amostra, sendo encontrado em 42 traíras de sete das oito localidades de coleta, com exceção do Igarapé Curuçambá – município de Óbidos – PA. Quanto à morfologia cariotípica, este citótipo apresenta algumas particularidades; inicialmente nota-se uma grande diminuição de tamanho do par 1 para o par 2, e nota-se também grande diferença de tamanho entre os submetacêntricos 11, 12, e 13 e os demais cromossomos deste grupo (Figura 7a).



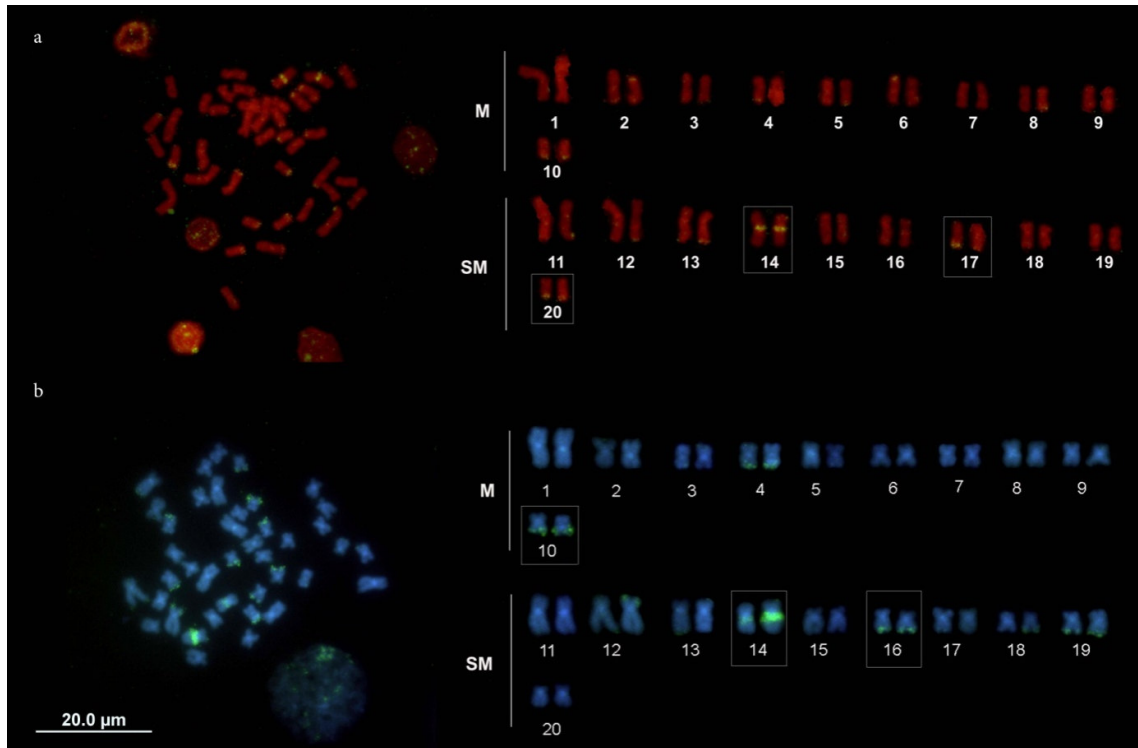
**Figura 7:** (a) Cariótipo em coloração convencional do espécime ORX – 1 (citótipo C); (b) NOR do espécime ORX-1; (c) NOR do espécime OBI – 15.

As NORs foram evidenciadas por nitrato de prata, na extremidade dos braços longos dos pares 10 e 16 (Figura 7b). Nas amostras das localidades de Oriximiná, Lago Maicá, Igarapé Urumari e Lago Juá. Entretanto, amostras provenientes dos Igarapés Mamauru e Pororoca (Óbidos, PA) mostraram um padrão diferente com sítios NOR localizados nos cromossomos 17 e 20 (Figura 7c).

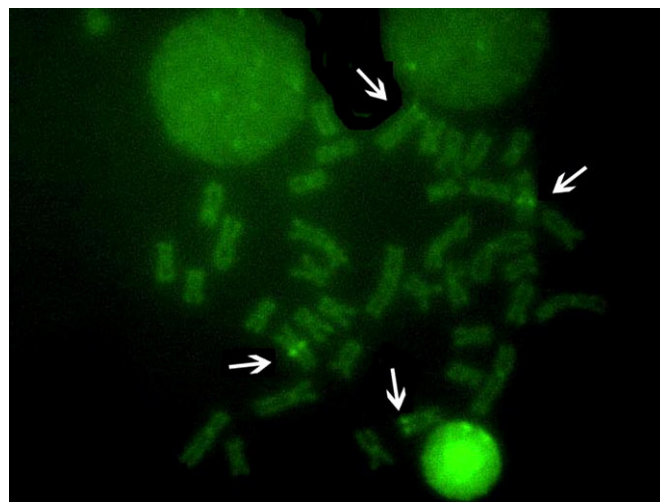
Experimentos de FISH com sondas rDNA 18S foram realizados em duas amostras do citótipo C (OBI-11 e ORX-12). Os resultados obtidos evidenciaram a presença de dois pares com marcação na região distal em ambas as amostras, confirmando a localização de sítios NOR nos pares 10 e 16 (ORX-12) e 17 e 20 (OBI-11), Figura 8. Além disso, esta metodologia também evidenciou uma forte marcação fluorescente intersticial no par 14 de ambas as amostras (Figura 8).

Uma amostra do citótipo C (OBI-11) foi submetida ao método de coloração por Cromomicina A3 e revelou quatro sinais positivos para sítios ricos em GC, sendo

dois nas extremidades de dois cromossomos submetacêntricos que, aparentemente não correspondem a um par de homólogos devido a diferença de tamanho, e dois sinais intersticiais no braço longo de um par homólogo (Figura 9).

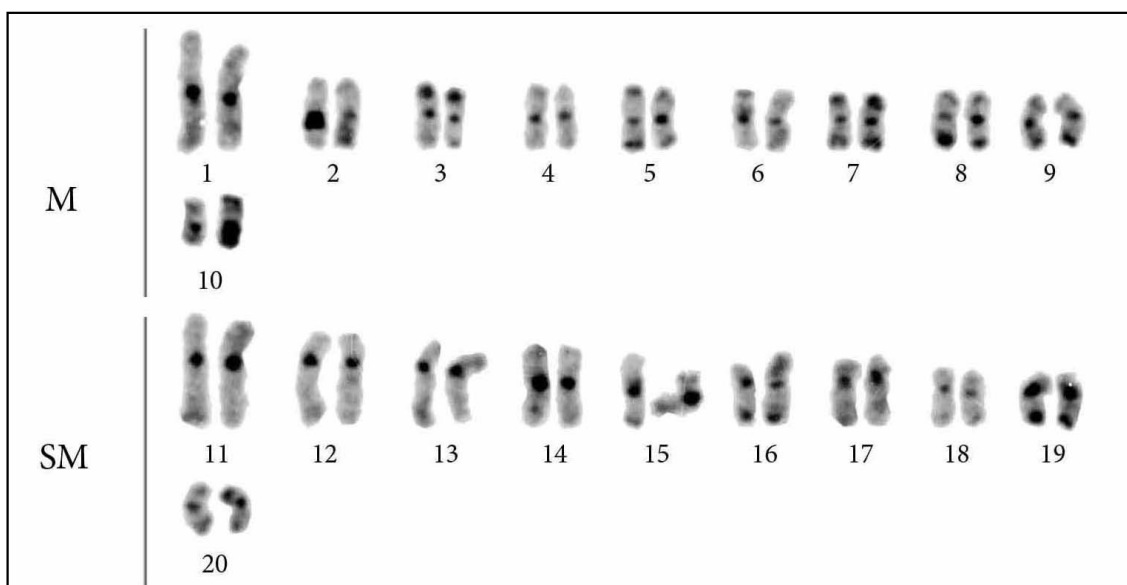


**Figura 8:** Detecção de NOR por FISH com sonda rDNA18S em *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (citótipo C). **a)** padrão evidenciado na amostra OBI – 11, sonda em amarelo e cromossomo contra corado com iodeto de Propídio; **b)** padrão evidenciado na amostra ORX – 12 ♂, sonda em verde, cromossomo contra corado com DAPI. Cromossomos hibridizados com a sonda destacados nas caixas.



**Figura 9:** Localização de sítios ricos em GC em *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (citótipo C), amostra OBI – 11.

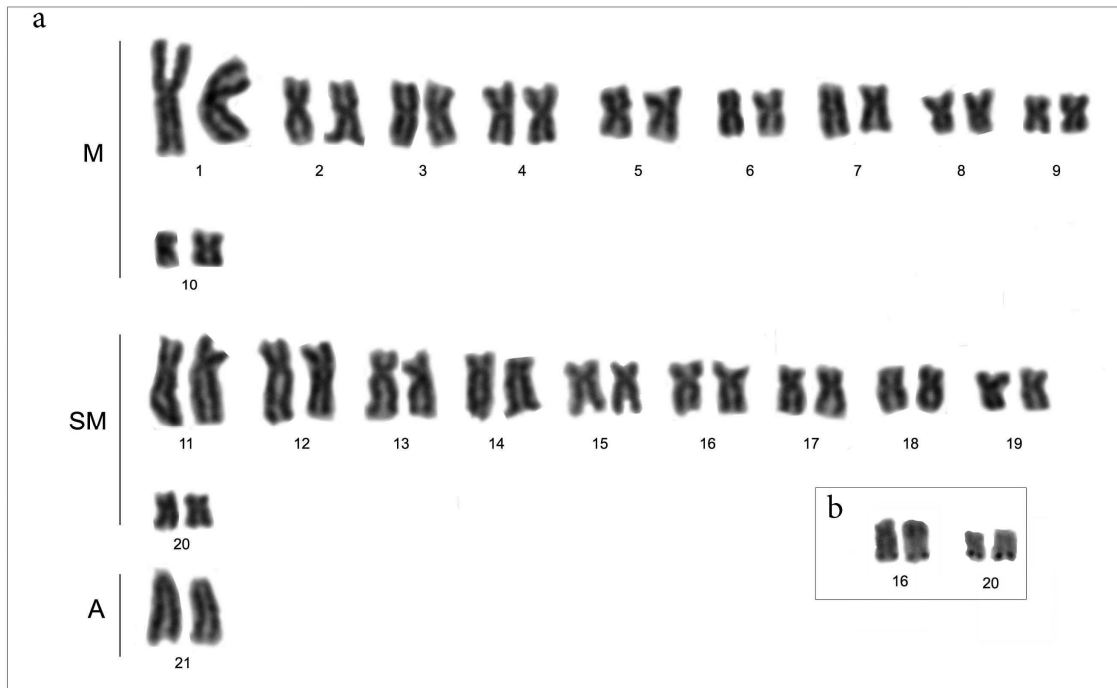
Na técnica de bandeamento C foi observada homogeneidade do padrão de bandas C entre os diferentes pontos de coleta. Notou-se a distribuição da heterocromatina constitutiva, exclusivamente, centroméricas dos pares 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14, 15 e 18; nas regiões centroméricas e telomérica dos pares 3, 9, 16 e 19; e marcações centroméricas e biteloméricas nos pares 5, 7 e 10. É interessante notar que o par 10 apresenta um grande bloco heterocromático que se estende pelo braço longo e define um aparente heteromorfismo de tamanho neste par (Figura 10).



**Figura 10:** Padrão de bandeamento C em *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas, (citótipo C, amostra ORX – 1).

## CITÓTIPO E

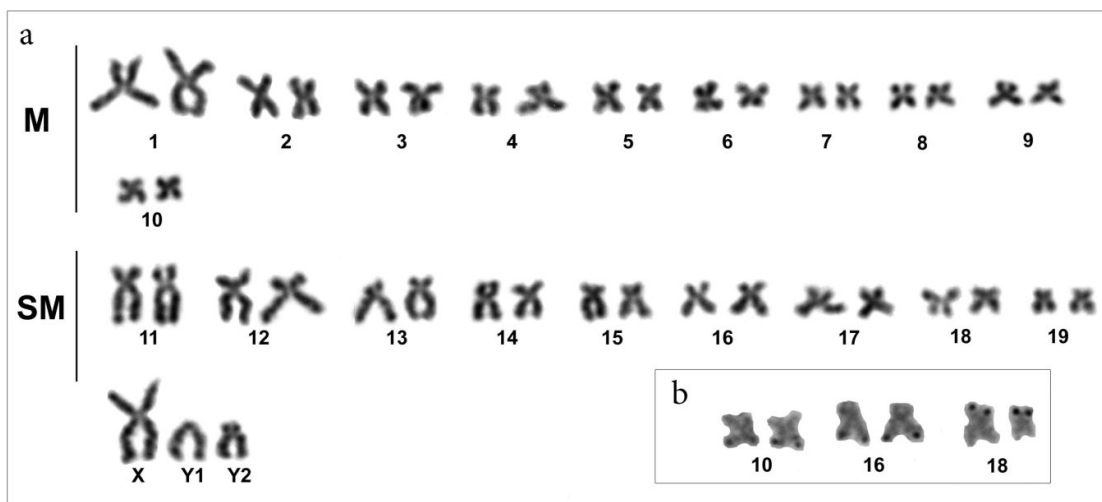
O citótipo E foi observado em apenas um espécime, proveniente do Igarapé Urumari, Santarém. O cariótipo apresentou  $2n=42$  cromossomos e a presença de um par acrocêntrico (par 21), característico deste citótipo (Figura 11a). As Regiões Organizadoras de Nucléolo foram evidenciadas no braço longo dos pares 16 e 20 (Figura 11b). Este citótipo não foi analisado por outros métodos citogenéticos.



**Figura 11:** a) Cariótipo de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (citótipo E, amostra URU – 8); b) Marcação de NOR com Nitrato de prata.

## CITÓTIPO G

Este citótipo foi registrado apenas na localidade do Igarapé Urumari, Santarém, nos espécimes STM-47 e STM-61, ambos machos. O cariótipo constitui-se por 20 metacêntricos, 20 submetacêntricos e um acrocêntrico, sendo evidenciado o sistema sexual  $XY_1Y_2$  (Figura 12a). A marcação dos sítios ativos de NOR foi localizada nos braços longos dos pares 10 e 16 e no braço curto do cromossomo 18 (Figura 12b). A coloração com Cromomicina  $A_3$  evidenciou apenas a marcação de um par cromossômico, provavelmente a região do braço curto do par 18 (Figura 13). Este citótipo não foi analisado por outros métodos citogenéticos.



**Figura 12:** Cariótipo em coloração convencional de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (citótipo G, amostra STM – 47). b) localização dos sítios NOR por Nitrato de Prata.



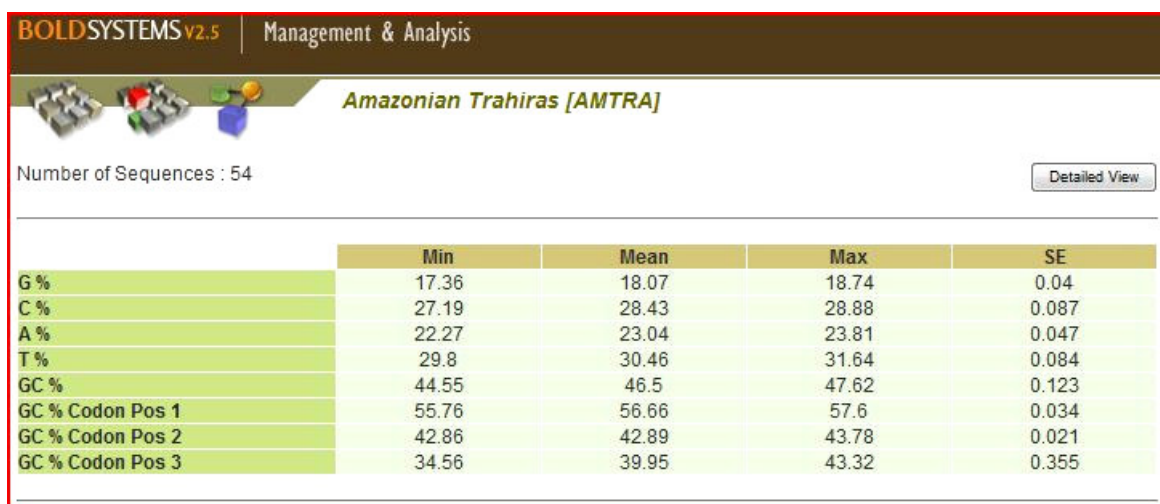
**Figura 13:** Localização de sítios ricos em GC de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (citótipo G, amostra STM – 61).

## 4.2 ANÁLISE MOLECULAR

### 4.2.1 Diversidade Genética

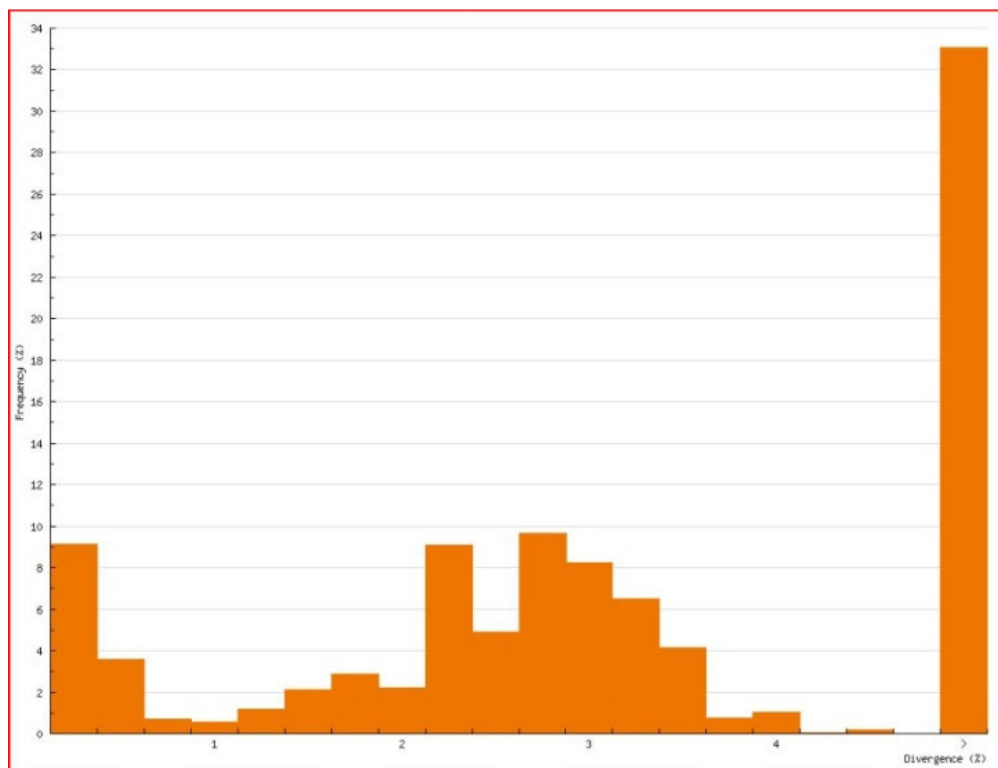
Foram geradas 54 sequências *DNA Barcode* de *Hoplias malabaricus* provenientes da região do Baixo Amazonas. Todas as sequências apresentaram 651 nucleotídeos. A composição nucleotídica média do gene *cox I* para os 54 indivíduos da amostra foi de: 18,07% para G, 28,43% para C, 23,04% para A e 30,46% para T. O conteúdo médio de GC foi de 46,5% e a percentagem média de GC na primeira, segunda e terceira base foram respectivamente, 56,66%, 42,89% e 39,95% (Figura 14). A distância nucleotídica intraespecífica média foi de 3,7%, sendo a mínima de zero e a máxima de 8%, com 1431 comparações (Figura 15).

Entre as 54 sequências foram observados 25 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,9399. Os sítios variáveis contaram-se 91 e invariáveis 560, o número total de mutações foi de 95. A diversidade nucleotídica foi  $Pi = 0,03526$ .



	Min	Mean	Max	SE
G %	17.36	18.07	18.74	0.04
C %	27.19	28.43	28.88	0.087
A %	22.27	23.04	23.81	0.047
T %	29.8	30.46	31.64	0.084
GC %	44.55	46.5	47.62	0.123
GC % Codon Pos 1	55.76	56.66	57.6	0.034
GC % Codon Pos 2	42.86	42.89	43.78	0.021
GC % Codon Pos 3	34.56	39.95	43.32	0.355

**Figura 14:** Composição nucleotídica do gene *cox I* (651 pb) em 54 espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes da região do Baixo Amazonas. Valores mínimos, médios e máximos em percentagem, SE (erro padrão).



**Figura 15:** Distribuição da divergência nucleotídica intraespecífica em *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas (n=54).

#### 4.2.2 Análise de agrupamentos

As topologias geradas no BOLD e no programa MEGA indicaram claramente a formação de pelo menos dois grupos bem delimitados na presente amostra, ambos com suporte estatístico (*Bootstrap*) de 99% (Figura 16). O primeiro grupo (Gp1) compreende 43 amostras de todas as localidades de coleta, incluindo peixes com cariótipos  $2n=40$ , 41 e 42 cromossomos; enquanto que, o segundo grupo (Gp2) foi formado por 11 amostras, de três localidades (Óbidos, Lago Maicá, e Oriximiná) e todos os peixes deste grupo mostraram cariótipos com  $2n=40$  cromossomos.

A divergência nucleotídica média do grupo *H. malabaricus* - Gp1 foi de 2,2% (erro padrão=0,003) e no grupo Gp2 foi de 0,1% (erro padrão=0,001), Tabela 6. A distância média entre ambos os grupos de *H. malabaricus* foi de 7,2% (Tabela 7).





**Tabela 6:** Divergência nucleotídica média nos grupos de *Hoplias malabaricus* (Gp1 e Gp2) e grupos externos (*Rhamdia* e *Hepsetus*), obtidas no programa MEGA, usando-se o modelo K2P.

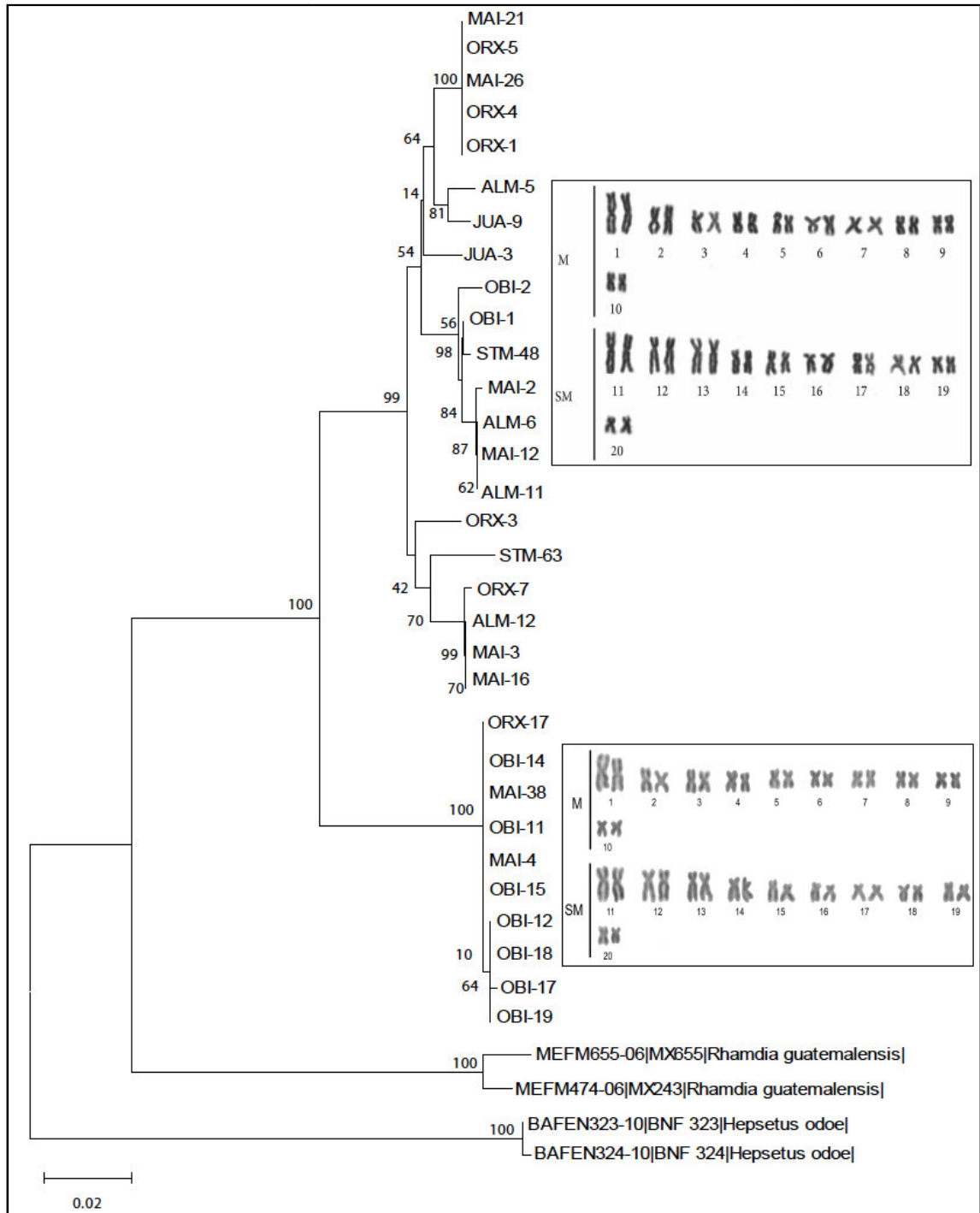
<b>Táxons</b>	<b>Divergência Média</b>	<b>Erro Padrão</b>
<i>H. malabaricus</i> - Gp1	2,2%	0,3%
<i>H. malabaricus</i> - Gp2	0,1%	0,1%
<i>Rhamdia</i>	1,8%	0,5%
<i>Hepsetus</i>	0,2%	0,2%

**Tabela 7:** Distância média entre os grupos de *Hoplias malabaricus* (Gp1 e Gp2) e grupos externos (*Rhamdia* e *Hepsetus*), obtidas no programa MEGA, usando o modelo K2P.

	[1]	[2]	[3]	[4]
[1] <i>Hoplias malabaricus</i> - Gp_1	-	-	-	-
[2] <i>Hoplias malabaricus</i> - Gp_2	7,2%	-	-	-
[3] <i>Rhamdia</i>	19,3%	19,2%	-	-
[4] <i>Hepsetus</i>	23,7%	24,7%	25,1%	-

Para se estimar a divergência molecular entre diferentes citótipos de *H. malabaricus*, o banco de dados das sequências foi reduzido em subamostras representativas dos citótipos. Inicialmente, analisou-se o citótipo C por apresentar maior frequência na amostra. A topologia obtida também evidenciou dois clados fortemente apoiados por altos valores de *Bootstrap*, um dos clados é formado pelos espécimes de citótipo C do grupo Gp1 e outro é o próprio Gp2 (Figura 17). Tomou-se este último clado (grupo Gp2) como representativo do citótipo C em comparação com os demais citótipos.

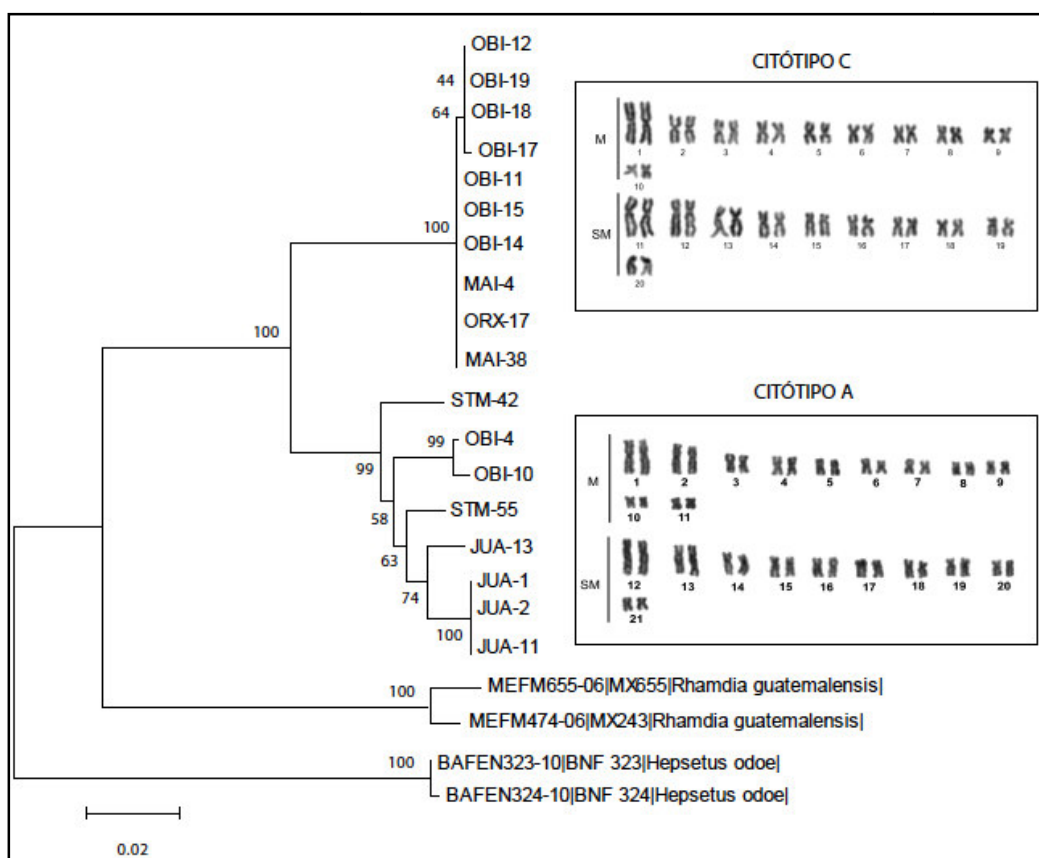
Ao restringir a análise entre o citótipo C e o citótipo A, foi encontrada uma variação intraespecífica (grupo) no citótipo C de 0,1% e no citótipo A de 2,3%, com separação entre os citótipos com valor de 7,4% (Tabela 8). A divergência entre os citótipos A e C também é notada na topologia da árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (Figura 18). Comparando-se os citótipos C e G, foi observada uma divergência de 7,5% (Tabela 9), também evidenciada na árvore filogenética (Figura 19). Devido à baixa amostragem do citótipo E (n=1) não foi possível verificar a distância intraespecífica para este citótipo, entretanto, em comparação com o citótipo C, pôde-se estimar a distância entre os dois citótipos de 6,9% (Figura 20).



**Figura 17:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir do DNA Barcode em *Hoplias malabaricus* (citótipo C) da região do Baixo Amazonas. Os números nos nodos indicam valores de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas, as imagens correspondem às amostras ALM-5 (Superior) e ORX-17 (Inferior).

**Tabela 8:** Distância média entre os citótipos A e C de *Hoplias malabaricus* obtidas no programa MEGA, usando o modelo K2P.

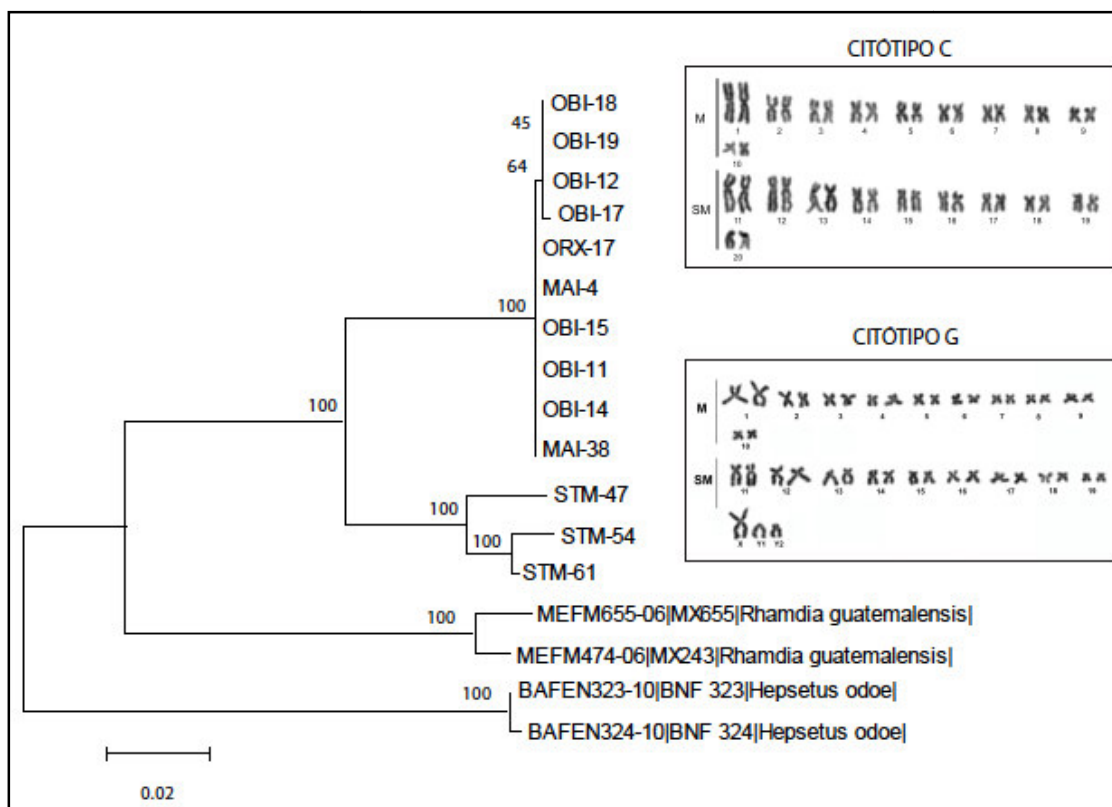
	[1]	[2]	[3]
[1] Citótipo C	-	-	-
[2] Citótipo A	7,4%	-	-
[3] Grupo Externo	22%	21,5%	-



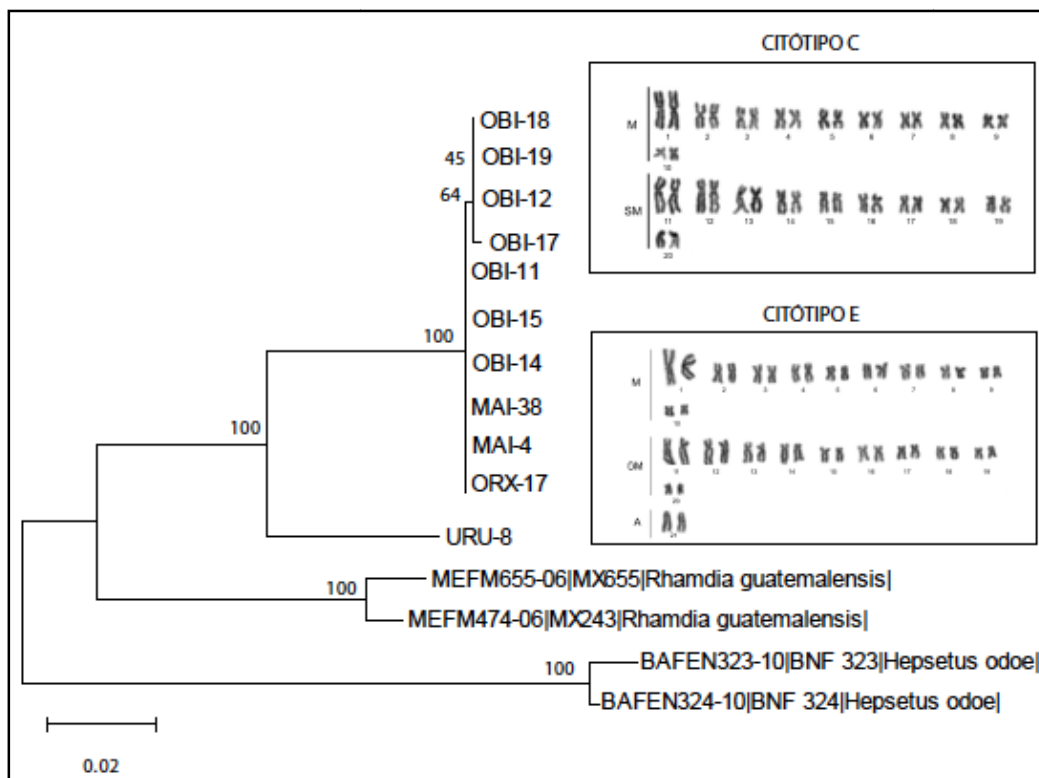
**Figura 18:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de *Hoplias malabaricus* (citótipos A e C) da região do Baixo Amazonas. Os números nos nodos indicam valores de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas.

**Tabela 9:** Distância média entre os grupos de *Hoplias malabaricus* do citótipo C, citótipo G e grupo externo, obtidas no programa MEGA, usando o modelo K2P.

	[1]	[2]	[3]
[1] Citótipo C	-	-	-
[2] Citótipo G	7,5%	-	-
[3] Grupo Externo	22%	22%	-



**Figura 19:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de *Hoplias malabaricus* (citótipos C e G) da região do Baixo Amazonas. Os números nos nodos indicam valores de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas.



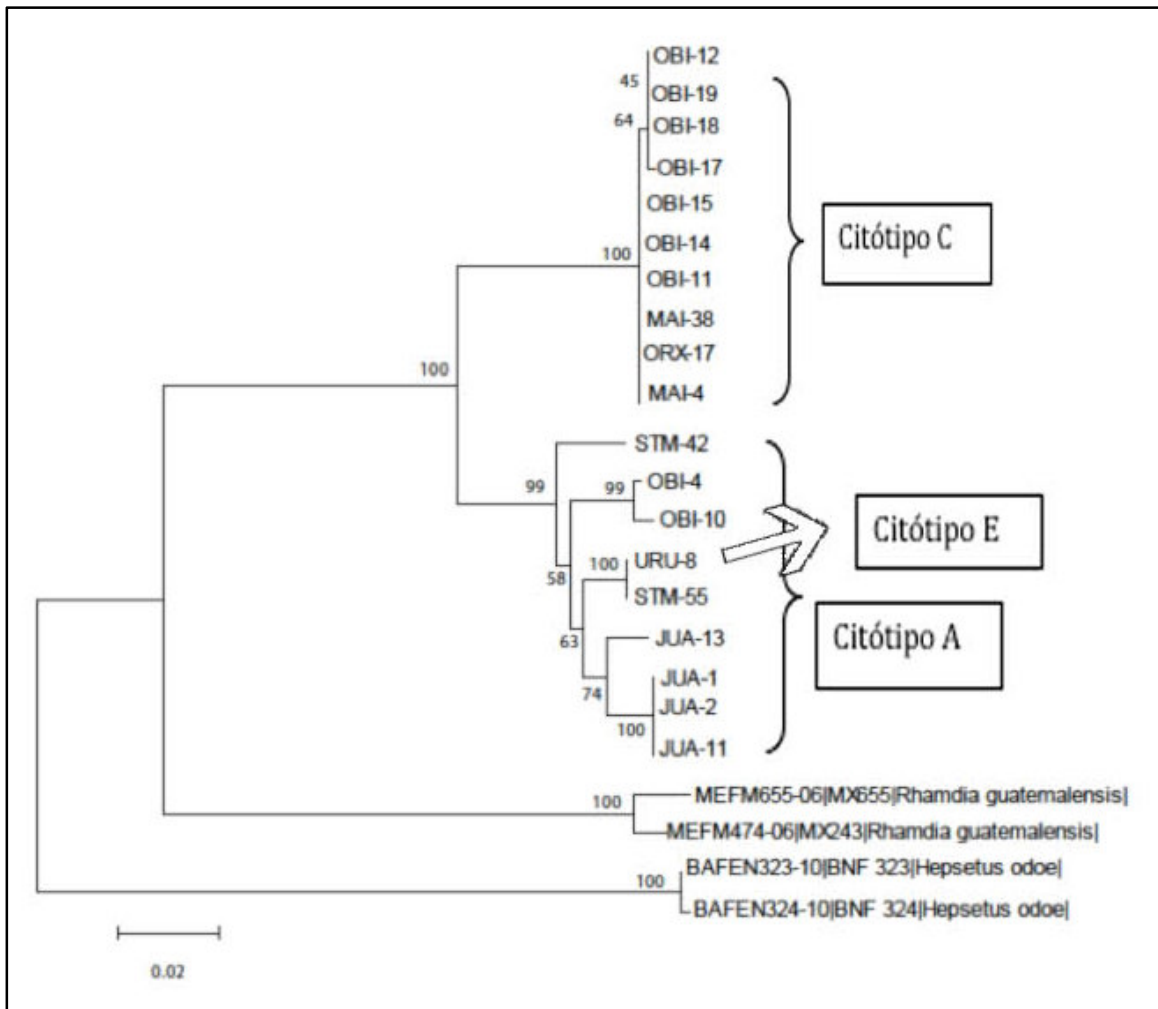
**Figura 20:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de *Hoplias malabaricus* (citótipos C e E) da região do Baixo Amazonas. Os números nos nós indicam valores de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas.

Uma comparação entre amostras de citótipo C ( $2n=40$ ) e citótipos A e E ( $2n=42$ ) mostra uma associação entre os dois últimos, sendo este grupo ( $2n=42$ ) separado do citótipo C (Figura 21). Nota-se também no citótipo A uma separação entre amostras do Lago Juá e Igarapé Curuçambá, Óbidos.

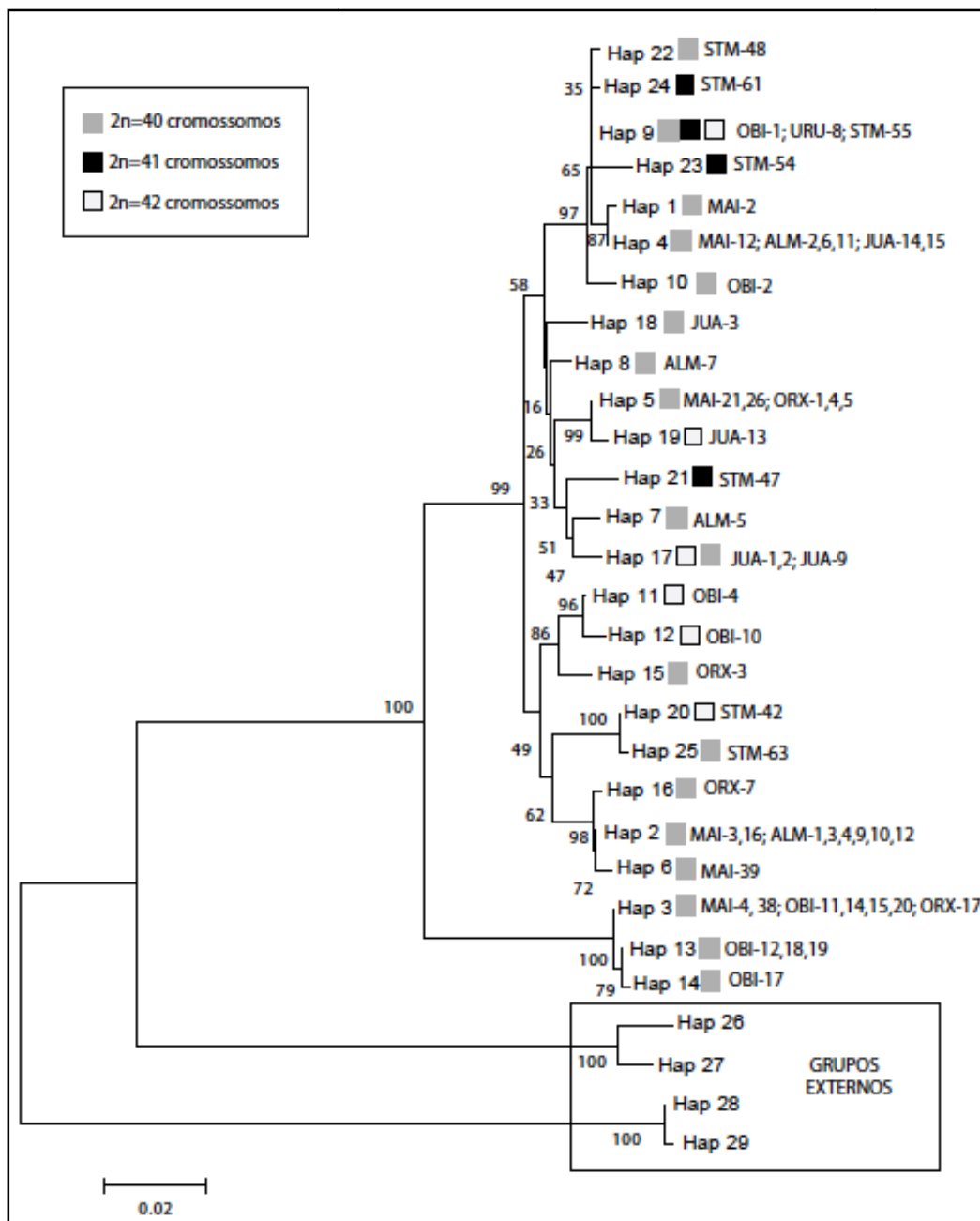
A análise da diversidade haplotípica revelou que dos 25 haplótipos encontrados, 18 são haplótipos únicos e sete são compartilhados, sendo que o Hap-17 é compartilhado entre indivíduos da mesma localidade (Lago Juá), enquanto que, os demais são compartilhados entre duas até três localidades (Figura 22). Nota-se que a localidade do Lago Maicá (Santarém) é a que mais compartilha haplótipos, no total de quatro haplótipos compartilhados com as seguintes localidades: Almeirim (Hap-4, 2); Lago Juá (Hap-4); Oriximiná (Hap-3, 5); Óbidos, Igarapés Pororoca e Mamaurú (Hap-3).

A distinção molecular do grupo Gp2 (citótipo C,  $2n=40$ ) também foi evidenciada pela análise de compartilhamento de haplótipos (Figuras 22, 23). Este grupo compartilha exclusivamente os haplótipos 3, 13 e 14, e está separado por 37 mutações na rede de haplótipos (Figura 23). Os haplótipos 9, 4, 5, 2 e 3 foram

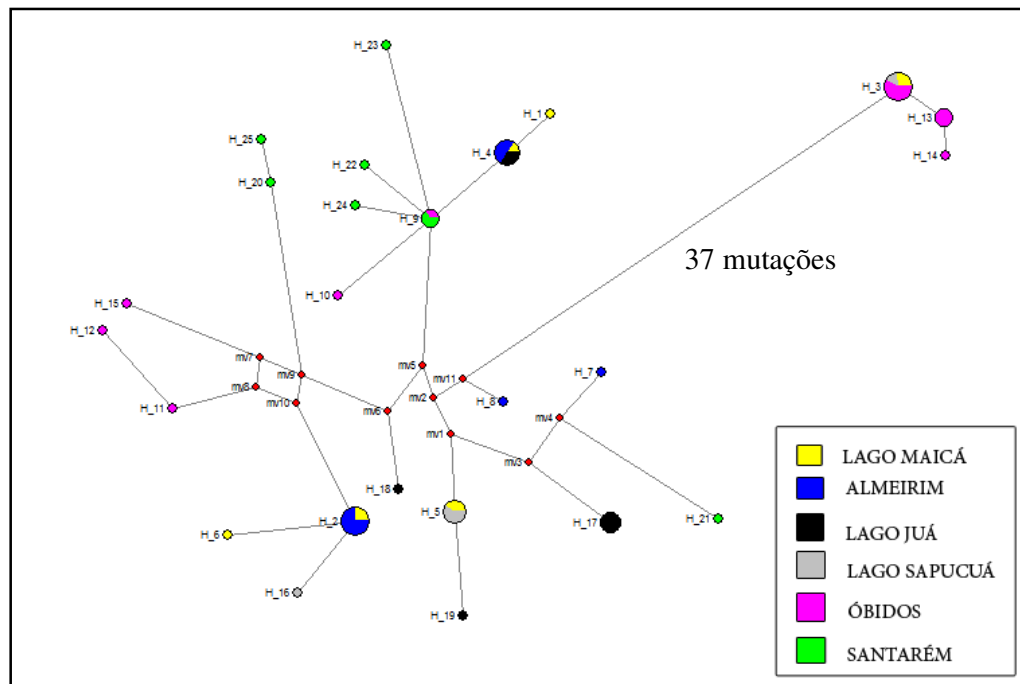
compartilhados entre localidades e também, entre indivíduos de citótipos diferentes, é o caso do haplótipo 9, por exemplo, compartilhado entre o citótipo C (OBI-1), citótipo E (URU-8) e citótipo A (STM-55).



**Figura 21:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (modelo K2P) obtida a partir de DNA Barcode de *Hoplias malabaricus* (citótipos A, C e E) da região do Baixo Amazonas. Os números nos nodos indicam valores de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas.



**Figura 22:** Árvore de agrupamento de vizinhos (K2P) de haplótipos de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas.



**Figura 23** : Rede de haplótipos de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas, obtida pelo método *Median-Joining*.



## 5 DISCUSSÃO

O citótipo A é amplamente distribuído nas outras bacias hidrográficas do Brasil e já foi previamente registrado na bacia amazônica (BERTOLLO *et al.* 2000; VICARI *et al.* 2001, 2005; SANTOS *et al.* 2009, CIOFFI *et al.* 2009; CIOFFI e BERTOLLO, 2010). Neste estudo, os espécimes foram encontrados no Igarapé Curuçambá, Óbidos-PA e em simpatria com o citótipo C no lago do Juá, e citótipos G e E no igarapé Urumari, Santarém-PA, respectivamente. Não se detectou variação quanto a fórmula cariotípica de  $22M+20SM$  e do padrão de bandas C. Entretanto, foi evidenciada a diferenciação de sítios de NOR. Os espécimes de Óbidos apresentaram dois pares enquanto que, os espécimes de Santarém apresentaram dois pares sendo um com NOR bitelomérica. Variação do número de NOR e presença de NOR bitelomérica, assim como variação da fórmula cariotípica tem sido verificada entre populações de *Hoplias malabaricus* do citótipo A nas diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 10). Sítios intersticiais de NOR no citótipo A foram evidenciados em amostras de São Paulo, porém neste estudo as amostras da não mostraram quaisquer sinais intersticiais positivos para hibridização da sonda rDNA 18S.

O citótipo C foi o mais freqüente na população de *Hoplias malabaricus* do Baixo Amazonas. A análise da fórmula cariotípica desse citótipo evidenciou 10 pares metacêntricos e 10 submetacêntricos. Amostras do rio Bento Gomes e rio Poconé, ambos do estado de Mato Grosso, apresentaram fórmula cariotípica de sete pares metacêntricos e 13 submetacêntricos (CIOFFI *et al.*, 2009; CIOFFI e BERTOLLO, 2010). Portanto, demonstra-se aqui uma variação quanto à fórmula cariotípica entre as populações de *Hoplias malabaricus* da bacia amazônica (Baixo Amazonas-PA) e do estado do Mato Grosso. Diferenças adicionais em outros marcadores citogenéticos também foram encontradas na comparação com amostras do estado do Mato Grosso (Tabela 11).

**Tabela 10:** Variação cariotípica dentro do citótipo A. (-) indica dados ausentes, (#) indica resultado não visualizado. T-telomérica, BI-bitelomérica, C-centromérica.

Local	Fórmula Cariotípica	Pares das NOR		FISH rDNA 18S		Autor
		T	C	T	C	
<b>Região Sul</b>						
Córrego Bolaxa - RS	22M + 20SM	2 pares não identificados	#	-	-	1
Rio Grande Passos- (RS)	22M + 20SM	1 par não identificado	1 par BI não identificado	-	-	1
Rio Iguaçu, Palmeira-PR	24M + 18SM	16BI*, 21	16*	10, 21	16	2,3
<b>Região Sudeste</b>						
Rio Ribeira (SP, PR)	24M + 18SM	10, 21	#	10, 21	16	3
Rio Tibagi (SP, PR)	24M + 18SM	10BI, 21	#	10, 21	16	3
Rio Ivaí (SP, PR)	24M + 18SM	10BI, 21	#	10, 21	16	3
Res. Jurumim , Avaré - SP	24M + 18SM	1 par não identificado	1 par BI não identificado	-	-	1
Guaporé São Carlos-SP	20M + 22SM	1 par não identificado	1 par BI não identificado	-	-	1
Rio Pântano, Descalvado - SP	22M + 20SM	5 (BI), 18, 21	16	5 (BI), 18, 21	16	6
<b>Região Centro-Oeste</b>						
Córrego 2 de Agosto Araguaiana-MT	20M + 22SM	1 par não identificado 2, 1 BI	1 par BI não identificado	-	-	1
Rio Tombadouro	22M + 20SM	cromossomo marcado	#	2 não identificados	1 não identificado	4
Rio Jacaré	22M + 20SM	1 par não identificado	#	2 não identificados	1 não identificado	4
<b>Região Norte</b>						
Igarapé Mindu, Manaus - AM	24M + 18SM	1 par não identificado	#	-	-	1
Igarapé Curuçambá-Óbidos-PA	22M + 20SM	17, 20	#	17, 20	#	5
Lago Juá, Santarém-PA	22M + 20SM	3BI , 16	#	-	-	5
Igarapé Urumari, Santarém-PA	22M + 20SM	3BI , 16	#	-	-	5

**Fonte:** (1) Born e Bertollo (2001); (2) Vicari *et al.* (2003); (3) Vicari *et al.* (2005); (4) Santos *et al.* (2009); (5) Presente estudo; Cioffi *et al.* (2009).

(\*) No trabalho de Vicari *et al.* (2003) apenas um cromossomo desse par foi marcado.

**Tabela 11:** Variação cariotípica dentro do citótipo C entre amostras dos estados do Pará e do Mato Grosso. (-) indica dados ausentes, (=) indica mesmo resultado da NOR. T-telomérica, I- intersticial, BI-bitelomérica, C-centromérica.

Local	Fórmula Cariotípica (pares)	CMA <sub>3</sub>	Pares das NOR		FISH rDNA 18S		Autor
			T	C	T	C	
Rio Bento Gomes-MT	7M + 13SM	-	5, 13, 15 e 19	11	=	11	1
Rio Poconé-MT	7M + 13SM	1C	4 pares não identificados	11	=	11	2
Região 1 <sup>+</sup>	10M + 10SM	-	10 e 16	Não evidenciado	=	14	3
Região 2 <sup>++</sup>	10M + 10SM	2T + 1C	17 e 20	Não evidenciado	=	14	3

**Fonte:** (1) Cioffi *et al.* (2009); (2) Cioffi e Bertollo *et al.* (2010); (3) Presente estudo.

(<sup>+</sup>) Correspondente às localidades: Lago Maicá – Santarém – PA; Lago Juá – Santarém – PA; Almeirim – PA; Lago Sapucaá – Oriximiná – PA e Igarapé Urumari – Santarém – PA.

(<sup>++</sup>) Correspondentes às localidades do município de Óbidos – PA: Igarapé Pororoca e Igarapé Mamaurú.

No citótipo C, os experimentos de FISH com sondas rDNA 18S confirmaram as posições da NOR previamente demonstrada por Nitrato de Prata. Entretanto, revelaram um sinal de hibridização no par 14 que não se mostrou marcado por Nitrato de Prata em nenhum experimento. Podemos interpretar este resultado como um falso positivo para detecção da NOR por FISH devido à possível hibridização cruzada com região de heterocromatina constitutiva deste par. O experimento com CMA3 evidenciou um pequeno sítio intersticial rico em GC que provavelmente corresponde ao mesmo sítio marcado pela FISH no par 14.

Casos de hibridização cruzada têm sido reportados em outras espécies, por exemplo, em *Astyanaxjaneiroensis* (EIGENMANN, 1908) (VICARI *et al.*, 2008). Por outro lado, Cioffi *et al.* (2009) encontraram NOR intersticial no citótipo C (par 11) demonstrada tanto por FISH, quanto por Nitrato de Prata, neste mesmo trabalho NORs intersticiais foram demonstradas nos citótipos A, B e D. Portanto, na luz de tais evidências, não se pode descartar a hipótese de que os sítios intersticiais de NOR no citótipo C da bacia amazônica (presente estudo) existem de fato, como evidenciado pela FISH, mas estariam submetidos a algum processo de inativação gênica, caracterizando-os como NOR silenciosa.

Devido os citótipos G e E serem exclusivos da bacia amazônica (BERTOLLO *et al.*, 2000) e estudos genéticos nessas populações serem bastante escassos, não foi possível uma análise comparativa desses citótipos com dados da

literatura. Nesse estudo se reporta pela primeira vez o padrão de CMA<sub>3</sub> no citótipo G.

Os resultados de divergência molecular do gene *cox I* evidenciam claramente a separação de dois grupos na amostra de *H. malabaricus* do Baixo Amazonas, apoiados por uma distância média de 7,2% (Tabela 7). Um dos grupos (Gp1, Figura 16) incluiu espécimes das oito localidades amostradas e citótipos A, C, G e E, enquanto que o segundo grupo (Gp2) incluiu apenas espécimes do citótipo C de três localidades. A heterogeneidade do grupo Gp1 é também refletida no valor de distância média do grupo (2,2%) e no número de haplótipos compartilhados (22). Por outro lado, o grupo Gp2 compartilha apenas três haplótipos e distância média de 0,1%.

A identidade do grupo Gp2 também foi preservada quando se comparou com todos os demais citótipos mantendo uma distância média de 7,5% com o citótipo G, e 7,4% com o citótipo A (Tabelas 8 e 9). Considerando o valor limiar mínimo de 2% de distância média para a delimitação de espécies animais (HEBERT *et al*, 2003; 2004; RATNASINGHAM e HEBERT, 2007) os níveis de divergência encontrados aqui podem ser considerados elevados. Em alguns grupos de peixes, os valores de divergência nucleotídica do gene *cox I* suficientes para diagnosticar espécies são variáveis. Distâncias de 1,8% a 2,2% foram suficientes para delimitar espécies de surubim, gênero *Pseudoplatystoma* (ORTIZ *et al*, 2010), entretanto, em tubarões observou-se níveis de 4,64% a 10,64% (YEARSLEY *et al*, 1999).

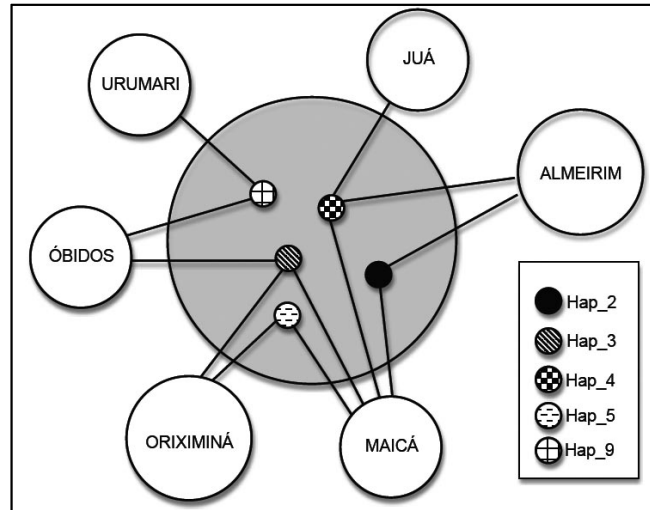
Entendemos que a variação nucleotídica do gene *cox I* em *H. malabaricus* do Baixo Amazonas reforça a hipótese do complexo de espécies crípticas e evidencia um grupo que pode representar uma espécie não descrita (grupo Gp2). Entretanto, embora muitos estudos sejam bem sucedidos em revelar espécies novas a partir de sequências DNA *barcode*, há poucas pesquisas que trabalham para a resolução da problemática de complexos de espécies além do que, há um embate muito grande para a aceitação da metodologia, devido utilizar dados de apenas um gene.

A metodologia de DNA *Barcoding* embora tenha se popularizado ainda é alvo de debates quanto a sua eficiência na identificação de espécies derivadas de processos de especiação recente (HEBERT *et al*, 2004a; LUKHTANOV *et al*, 2009; ORTIZ *et al*, 2010).

No presente estudo com *Hoplias malabaricus*, foi observado que há o compartilhamento de haplótipos em todos os pontos de coleta (Figura 24). Com exceção do Hap-3 todos os outros haplótipos compartilhados foram observados dentro do grupo Gp1, que também incluem diferentes citótipos (A, C, G e E), além disso, é possível notar uma possível diferenciação de até cinco haplogrupos dentro grupo Gp1. Estes resultados são interpretados como evidência de fluxo gênico entre as diferentes localidades amostradas tendo como elemento de conectividade a calha principal do Rio Amazonas, uma vez que todas as localidades encontram-se as margens ou nas proximidades deste rio.

O Lago Maicá (Santarém), localizado a margem direita do Rio Amazonas, parece ter uma importante contribuição no pool gênico destas populações, é o que mostrou a interpretação da análise de compartilhamento de haplótipos e pela riqueza de haplótipos (seis). Esta localidade tem uma posição geográfica relativamente central no trecho do Baixo Amazonas investigado aqui, e sendo um lago de várzea sofre forte influencia sazonal do regime de cheia do Rio Amazonas, o que pode favorecer no processo de dispersão passiva de *Hoplias malabaricus* que ocorre naturalmente com a cheia e coincide com o período reprodutivo (MARQUES *et al*, 2001).

Estranhamente o Lago Maicá e Igarapé Urumari (Santarém) são as localidades mais próximas entre si, entretanto, não compartilham haplótipos. O citótipo C foi encontrado em ambas as localidades e o Igarapé Urumari foi a que apresentou maior diversidade cariotípica (citótipos A, C, G e E). Esta localidade compartilha apenas um haplótipo (Hap-9) com a localidade Igarapé Pororoca (Óbidos). Neste caso, é interessante notar que os três indivíduos que compartilham este haplótipo possuem cariótipos distintos: OBI-1 ( $2n=40$ , citótipo C); URU-8 ( $2n=42$ , citótipo E) e STM-55 ( $2n=42$ , citótipo A). Sugere-se que este traço genético pode representar um caráter ancestral compartilhado por diferentes linhagens do grupo após o processo de diversificação cariotípica.



**Figura 24:** Representação da rede de haplótipos das populações estudadas. Óbidos está representando os dois pontos de coleta da região desse município.

O uso combinado de marcadores citogenéticos e moleculares se mostrou adequado e robusto para investigação da diversidade genética do complexo *Hoplias malabaricus* na bacia amazônica. Os padrões encontrados aqui descrevem parcialmente as intrincadas relações evolutivas deste grupo de peixes e aponta para a necessidade de futuras investigações. Marcadores genéticos populacionais deverão ser adotados para esclarecer as questões pertinentes a estrutura e dinâmica das populações de traíra da bacia amazônica, além disso, comparações adicionais com populações de outras bacias hidrográficas são importantes para se compreender melhor a história evolutiva e padrões biogeográficos deste complexo de espécies.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do estudo citogenético e molecular no complexo de espécies *Hoplias malabaricus* na região do Baixo Amazonas, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- As populações de *Hoplias malabaricus* da região do Baixo Amazonas apresentam os citótipos A, C, E e G;

- Os sítios ativos de NOR nas populações de Óbidos foi conservado entre os citótipos A e C; nas demais localidades houve diferenciação desse padrão de entre os citótipos A, C, E e G;

- O padrão de bandeamento C foi mantido entre os citótipos não apresentando variação mais evidente a ponto de inferir uma possível diferenciação por localidades;

- A marcação de sítios de rDNA 18S no citótipo C foi evidenciada nos mesmos pares de NOR com marcação intersticial que sugerimos ser o par sexual;

- O padrão de Cromomicina A<sub>3</sub> evidenciou apenas a região intersticial rica em GC, sendo este descrito pela primeira vez no citótipo G;

- Os valores de divergência nucleotídica dos espécimes evidenciaram a separação de dois clados (Gp1 e Gp2);

- Foi observado 25 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,9399;

- Em comparação do grupo Gp2, identificado como citótipo C, com as sequências dos demais citótipos evidenciou valores de divergência de 7,4% comparado ao citótipo A, 7,5% com o citótipo G e 6,9% com o citótipo E.

- Os resultados de variação molecular e citogenética corroboram a hipótese de que o táxon nominal *H. malabaricus* abriga um complexo de espécies.

## 7REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389 – 3402, 1997.

ALMEIDA-TOLEDO, L, F. **Cytogenetic Markers in Neotropical Freshwater Fishes**. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P. AND RÖHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16: 37–48. 1999

BARTHEM, R.B. In: Capobianco, J.P.R. *et al.*, (org). Biodiversidade na Amazônia Brasileira. **Instituto Socioambiental**. São Paulo: Estação Liberdade. p. 60-78. 2001.

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.

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

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.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S. & CANO, J. The X1X2Y Sex Chromosome System in the Fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and Chromosome Replication Banding. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499, 1997a.

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, 1997b.

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



- BLANCO, D. R., *et al.* Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). Reviews in **FishBiology and Fisheries**. 2010.
- BLAXTER, M. L. The promise of DNA taxonomic. **The Royal Society**, 2004.
- 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**. 2000.
- BORN, G. G. & BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among alopatric population of the fish, *Hoplias malabaricus* cytotypes with  $2n = 42$  chromosomes. **Genetica**. 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.
- BRITO, S. G. C. Peixes do Rio Paranapanema. São Paulo. **Horizonte Geográfico**. 2003.
- BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L.R. *et al.* (Org). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**, 1 ed. Porto Alegre: Edipucrs. 1998.
- CALCAGNOTTO, D. **Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de análise do DNA mitocondrial**. Tese de Doutorado. 1998. 131p.
- CALCAGNOTTO, D., SCHAEFER, S.A. & DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetic Evolution**. 2005.
- CASIRAGHI *et al.* DNA barcoding: a six-question tourto improve users' awareness about the method. **Briefings in Bioinformatic**. 2010.
- CASTRO R. M. C.; CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Parana river basin, southern Brazil. **Ichthyol Explor Freshwater**, 7 (4):337-352. 1997.

CENTOFANTE, Liano. **Citogenética comparativa entre ictiofáunulas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da mantiqueira**. Tese. São Carlos: São Carlos: UFSCar, 2003.

CIOFFI, M. B., *et al.* Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. **Cytogenetic and Genome Research** 125, 132–141. 2009.

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**. 2009.

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** 1–8, 2010.

DERGAM, J. A.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotypic Diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná Basins, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**. 13,4, 755-766. 1990.

DERGAM J,A *et al.* Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers. **Genetics and Molecular Biology**. 1998.

DERGAM, J. A; PAIVA, S. R; SCHAEFFER, C. E; GODINHO, A. L; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 4, 379-387. 2002.

DONLON, T. A., LRRR, M., NEUCOM, S. R. AND MAGENIS, R. E. Localization of the restriction fragment length polymorphism D14SI (pAW101) to chromosome 14q32.1-32.2 by in situ hybridization. **Am. Journal of Human Genetic** 35: 1097-1106. 1983.

ELIAS, M. Hill *et al.* Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. P. Roy. **Sociedade Brasileira de Biologia. Sci.**, 274, 2881 – 2889, 2007.

FERREIRA E.J.G. ZUANON J.A.S. AND SANTOS G.M. Peixes Comerciais do Médio Amazonas: Região de Santarém, Pará. Brasília, **Edições IBAMA**. 214p. 1998.

FERREIRA, I. A., BERTOLLO, L. A. C. & MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S HindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenetic and Genome Research**. 2007.

FERRY *et al.* Species identification through DNA "Barcodes". **Genetic testing and molecular biomarkers**, vol 13, nº 3, Mary e Lieberg Inc. 2009.

FRANKHAM, R; BALLOU, J. D; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, 280p. 2008.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in Neotropical fish. NOR studies. **Italian Journal of Zoology**. 1998.

GONÇALVES, P. *et al.* **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação (mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 2009.

GOULDING, M. História natural dos rios Amazônicos. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá / CNPq / **Rainforest Alliance**, 208p. 1997.

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

GUERRA, M. IN. FISH – **Conceitos e aplicações na citogenética** / Organizado por Marcelo Guerra. 1 edição. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. p.1-29, 2004.

GÜNTHER, A. **Catalogue of the fishes in the British Museum**. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiidae in the collection of the British Museum. Cat. 1864.

HAAF, T., SCHMID, M., STEINLEIN, C. GALETTI, P. M. JR. & WILLARD, H. F. Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chromosome Research**, 1, 77–86, 1993.

HAJIBABAEI M, JANZEN DH, BURNS JM, HALLWACHSW, HEBERT PDN DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 103, 968–971, 2006.

HAJIBABAEI M, SINGER GA, CLARE EL Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biology**, 13:5–24, 2007.

HAJIBABAEI M, SINGER GA, HEBERT PD DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genet** 23: 167–172, 2007.

HALL, T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98. 1999

HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **The Royal Society**. 2003.

HEBERT PDN, PENTON EH, BURNS JM, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator*. **Plos Biology**;101:14812–7, 2004a.

HEBERT *et al.* Identifications of birds through DNA Barcodes. **Plos Biology**, 2004b.

HOWELL W. M. & BLACK D. A. Controlled silver staining nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

IVANOVA, Nathalia *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular ecology notes**, 2007.

JARMAN, S. N. & ELLIOTT, N. G. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. **Journal of Evolutionary Biology**, 13, 624–633, 2000.

KADUL, N.P. *et al.* Phylogeny of *Agrodiaetus hubneri* 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of COI and COII and nuclear sequences of EF-1 $\alpha$ : Karyotype diversification and species radiation. **Systematics Biology**. 53,; 278 – 298, 2007.

KERR, Kevin, C.R. *et al.* Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular ecology notes**. 2007.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 1980.

KOCK W.R.; MILANI P.C.; GROSSER K.M. **Guia ilustrado: peixes Parque Delta do Jacuí**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 2000.

KNOWLTON, N. Sibling species in the sea. **Annual Revision of Ecology Systematic** 24. 1993.

LEVAN, A.; FREDGA, K. and SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

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

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

LUCENA, A.C.S. Estudos filogenéticos da família characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, characiformes) **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, SP, Brasil. 1993

LUKHTANOV, V.A.; SOURAKOV, A.; ZAKHAROV, E.V.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding central asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. **Molecular Ecology Research**. 2009.

MARIA, L. **Diversidade Genética de *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae) no Rio Grande do Sul (Brasil)**. 87p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biociências – Zoologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARQUES, D.K.S.; GURGEL, H. C.B. & LUCENA, I. Época de reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zootecnia**. Juiz de Fora. 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.

MARTINS, C.*et al.* Tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**. 2006.

MATTOX, G. M. T.; TOLEDO-PIZA, M.; OYAKAWA, O. T. Taxonomic Study of *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) and *Hopliasmacrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae). **Copeia**. 2006.

MENDES, G. M.; FERREIRA, E. F. G.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus** . –Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, p. 144, 2006.

MESTRINER, C. A.*et al.* Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity** 85: 1–9, 2000.

MEYER CP, PAULAY G. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS Biology**;3: e 422.2005.

MEIER, R. *et al.* Barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraespecific variability and low identification success. **Systematic of Biology** 55: 715 – 728, 2006.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Ostariophysi, Teleostei)**. Tese de Doutorado não publicada, Universidade de São Paulo, 318p. 2007.

MORELLI, S. **Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero Hoplias, Grupo Lacerdae: macroestrutura cariotípica, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo**. Universidade Federal de São Carlos. Tese de Doutorado. 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 de junho de 2010.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4 Edition, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 2006.

NETTO-FERREIRA A. L. Relações Filogenéticas dos Gêneros de Lebiasinidae (Ostariophysi, Characiformes). **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. 2005.

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

ORTIZ, M. F. **Validação do DNA barcode como identificador de espécies: Um estudo de ampla amostragem com o gênero Pseudoplatystoma (SILURIFORMES; PIMELODIDAE) na Amazônia**. Dissertação (mestrado) Manaus, 2010.

OYAKAWA, O. T. **Relações filogenéticas das famílias Pyrrhulinidae, Lebiasinidae e Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes)**. Unpubl. Ph.D. dissertation, Museu de Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 1998.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. and FERRARIS JR, C.J. (eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 238-240. 2003

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**. 2009.

PINKEL D, STRAUME T, GRAY J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**. 1986.

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.; QUEROL, E.; PESSANO, E.; AZEVEDO, C. L. O.; TOMASSONI, D.; BRASIL, L. & LOPES, P. **Reprodução induzida de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), em tanques experimentais, na Região de Uruguaiana, Pampa Brasileiro**. Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguaiana, v. 1, n. 1, p. 46-57, 2003.

RATNASINGHAM S, HEBERT PD BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes** 7:355 – 364. 2007.

ROSA, R. **Estudos Citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)**. 102p. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo do Paraná, Universidade federal de Londrina, Londrina. 2006.

ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X. AND ROZAS, R. DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. **Bioinformatics**.2003.

RUBERT, **Marcélia. Estudos citogenéticos em diferentes populações do gênero *Hypostomus* (LORICARIIDAE HYPOSTOMINAE)**.Tese. Londrina, 2007.

SAITOU N, NEI M .The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**. 4:406–425. 1987.

SALVADORI, S.; DEINA, A. M.; COLOCCIA, E.; ROSSI, E.; ZUFARDI, O. Localization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic cels. **Chromosome Research**, Oxford, v.3, p.54-58, 1995.

SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory annual. 2 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, NY. 1989.

SANTOS, F. A. Variação cariotípica em traíras *Hoplias malabaricus* (Characiformes – Erythrinidae) proveniente dos lagos juá e maicá. 55p. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Universidade Federal do Pará, Santarém. 2009.

SANTOS, G, M; MÉRONA, B; JURAS, A, A; JÉJU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da usina hidrelétrica tucuruí**. Brasília: Eletronorte, 2004.



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

SAVOLAINEN V. *et al.* Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. (2005) 360:1805–1811.

SCHWEIZER, D. Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. **Springer-Verlag**. Berlin Heidelberg. 1976.

SEBERG, O. *et al.* Shortcuts in systematics A commentary on DNA-based taxonomy Trends. **Ecology Evolution**. 2003.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experiments Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**. 24. 2007.1596-1599p.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. and GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, submitted, June. 1994.

VARI, R. P. The Neotropical fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. **Smithsonian Contribution of Zoology**. 564. 97 pp.1995.

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, Iguçu, Ivaí e Ribeira (Ponta Grossa, PR)**. I. Dados Preliminares. PPGGEv/UFSCAR. 2001.

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

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO L.A.C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report

of the fish *Astyanax jانهiroensis*. **Cytogenetic Genome Research**. 2008.

VITTONI, Q. E. **Caracterização genética de traíras (Hoplias) da região norte brasileira**. Dissertação, UFPA, 2008.

WARD RW *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**. 2005.

WIEMERS, M.; FIEDLER, K. Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) **frontiers in Zoology**. 2007.

WOESE C.R.; FOX G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**. 1977

XIA, X. and XIE. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. 2001

YEARSLEY, G. K., LAST, P. R. & WARD, R. D. (EDS). Australian seafood handbook: an identification guide to domestic species. Australia: **CSIRO Marine Research**. 1999 (Reprinted with minor corrections, 2001.)