

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO E ANÁLISE COMPARATIVA DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Crenicichla* HECKEL, 1840 DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE DNA
REPETITIVO**

Belém

2017

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO E ANÁLISE COMPARATIVA DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Crenicichla* HECKEL, 1840 DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE DNA
REPETITIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha. Laboratório de Citogenética – CEABIO – UFPA

Belém - PA

2017

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO E ANÁLISE COMPARATIVA DE
QUATRO ESPÉCIES DE *Crenicichla* HECKEL, 1840 DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES DE DNA
REPETITIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Laboratório de Citogenética, CEABIO, UFPA

Avaliador: Prof^ª. MSc. Talita Fernanda Augusto Ribas

Laboratório de Citogenética, CEABIO, UFPA

Avaliador: Prof. MSc. Willam Oliveira da Silva

Laboratório de Citogenética, CEABIO, UFPA

Belém – PA

2017

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Dedico esse trabalho a minha família, em especial aos meus pais, que estiveram sempre atentos ao meu desenvolvimento ao longo de minha vida acadêmica, mas fundamentalmente no meu desenvolvimento como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por estar comigo em todos os momentos, iluminando meu caminho e me dando esperança de que eu conseguiria alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares, em especial meus pais que estão sempre presentes na minha vida, compartilhando os bons e os maus momentos e me incentivando a perseguir veementemente meus sonhos.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha, que acreditou no meu trabalho e no meu potencial, estando sempre atenta ao meu desenvolvimento, me incentivando e me mostrando meios de me aperfeiçoar como profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. MSc. Bruno Rafael Ribeiro de Almeida. Pelo acompanhamento diário, pelas discussões, pelas importantes contribuições ao desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

À Prof^a. Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi e ao Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka pelo importante apoio, infraestrutura e contribuição na realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que vivenciam e partilham de semelhantes batalhas, frustrações, descobertas e conquistas diárias nessa vida de pesquisador.

Aos meus amigos de graduação, em especial à Laiza, Luana, Ananda, Rafael, André, Lilian e Fabiano.

A todos meus professores da graduação pela importante contribuição na minha formação profissional.

A todas as instituições e órgãos que deram apoio financeiro e estrutural para a realização deste trabalho: UFPA, CAPES, Projeto Pró-Amazônia, CNPq, Bionorte, FAPESPA, Vale.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FAMÍLIA CICHLIDAE	1
1.2. O GÊNERO <i>Crenicichla</i>	3
1.2.1. Citogenética de Cichlidae com enfoque em <i>Crenicichla</i>.....	5
3. OBJETIVOS	8
3.1. OBJETIVO GERAL.....	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. AMOSTRAGEM	9
4.2. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	10
4.3. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS	10
4.4. TÉCNICA DE BANDEAMENTO C	11
4.5. TÉCNICA DE COLORAÇÃO POR AgNOR	11
4.6. MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE DNA REPETITIVO	12
4.6.1. Isolamento de sequências repetitivas	12
4.6.2. Nick-translation	12
4.6.3. Hibridização in situ fluorescente	13
4.6.4 <i>Fiber-FISH</i>.....	13
4.7. ANÁLISE DE IMAGENS	14
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSSÃO	19
7. CONCLUSÕES	22
8. REFERÊNCIAS	23

RESUMO

Crenicichla é o maior gênero entre os ciclídeos neotropicais com 86 espécies válidas e distribuição geográfica ao longo de toda América do Sul, com ocorrência na Amazônia, Guianas e rio da Prata na Argentina. A taxonomia das espécies deste gênero é de difícil descrição, principalmente devido a grande semelhança entre elas, especialmente entre os indivíduos juvenis. Visando encontrar marcadores citotaxonômicos e compreender a dinâmica evolutiva deste gênero analisamos as espécies: *Crenicichla johanna* (duas populações, Abaetetuba e Cametá, Pará), *Crenicichla saxatilis* (Bragança-PA), *Crenicichla regani* (Jejú-PA) e *Crenicichla* sp. “Xingu I” (Altamira-PA). Preparações cromossômicas foram submetidas às técnicas de coloração com Giemsa 5%, bandeamento C, AgNOR e FISH com sondas de sequência telomérica (TTAGGG)_n, DNA ribossômico 18S e 5S e elementos de transposição *Mariner* e *Rex1*. Realizou-se *fiber*-FISH em algumas amostras com co-localização de DNAs repetitivos. As espécies analisadas possuem 2n=48, mas diferem quanto à fórmula cariotípica. Heterocromatina constitutiva pode ser observada tanto na região pericentromérica quanto em regiões terminais e intersticiais. Um par de cromossomos portadores de sítios rDNA 18S foi observado na maioria das espécies, com exceção de *C. johanna*, em que foi registrada uma grande variação interpopulacional em relação a posição e quantidade de *clusters* no cariótipo, com presença de 6 sítios na população de Abaetetuba e 3 sítios na população de Cametá, e apresentando colocalização de sequências teloméricas e rDNA 18S. Apesar do grande número de marcações rDNA 18S observado em *C. johanna* a AgNOR ativa é simples em todas as espécies. Neste último caso, *fiber*-FISH mostrou que as sequências telômero-18S rDNA estão dispostas de forma intercalada. FISH com sonda de sequência telomérica evidenciou ITSs (sequências teloméricas intersticiais) em *C. johanna* e *C. saxatilis*. Os cariótipos das quatro espécies apresentaram rDNA 5S na região intersticial de um par acrocêntrico. Em todas elas, os elementos de transposição *Mariner* e *Rex1* apresentaram-se dispersos com um cluster de *Mariner* na região intersticial do braço curto do par 1 em *Crenicichla saxatilis*. Este estudo mostrou que apesar de apresentar 2n altamente conservado, as espécies do gênero *Crenicichla* possuem muitas diferenças microestruturais no cariótipo, tanto a nível interespecífico quanto intraespecífico. Existe associação de sequências de DNAs repetitivos nas duas populações de *Crenicichla johanna* e em *Crenicichla saxatilis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A FAMÍLIA CICHLIDAE

A família Cichlidae (Perciformes) é um dos grupos de peixes de água doce mais diversificado do mundo. Constitui-se de 1.300 espécies (com estimativa de 2000) sendo considerada a quarta maior família pertencente ao subfilo dos vertebrados (Kullander 1998). Sua distribuição geográfica abrange o continente africano (com o maior número de espécies), o Oriente médio (Iran e Síria), o sul da Índia e do Sri Lanka, as ilhas de Madagascar, Cuba e Hispaniola e as Américas Norte, Central e do Sul (KULLANDER, 1998, 2003; CHAKRABARTY, 2004) (Figura 1).

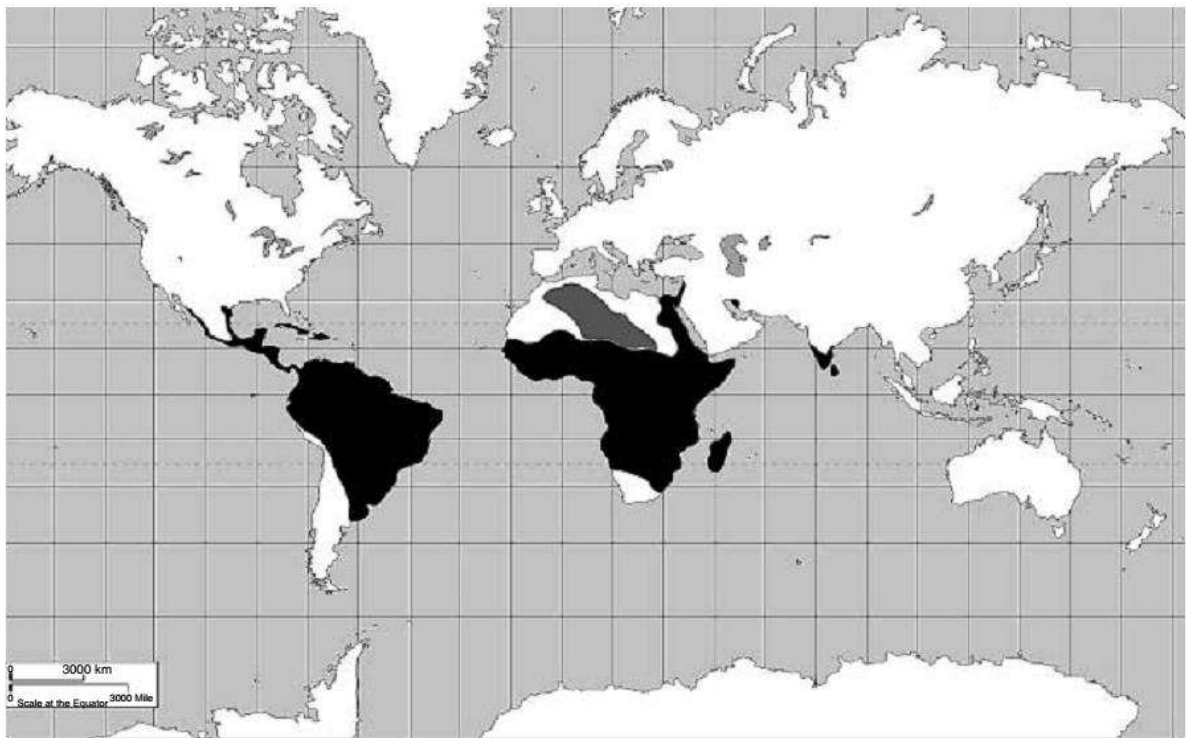


Figura 1: Distribuição mundial de Cichlidae segundo Sparks (2001).

Na América do Sul são conhecidas aproximadamente 291 espécies, distribuídas em 39 gêneros, sendo um grande número delas encontradas na Amazônia, possuindo grande importância na alimentação e no comércio de peixes ornamentais (Chao 1995; Kullander 2003).

Os peixes desta família podem ser encontrados em diferentes habitats, dentre os quais, igarapés, margens de rios, florestas alagadas, lagos e locais rochosos, tendo preferência por ambientes lênticos, existindo algumas espécies adaptadas a ambientes lóticos (LOWE-MCCONNELL, 1991; KULLANDER, 2003).

São animais territorialistas que apresentam um notável cuidado parental, e alimentam-se, na maioria das vezes, de pequenos invertebrados e vegetais, apesar de alguns grupos se alimentarem de outros peixes e de plâncton (Kullander 2003).

A família Cichlidae é monofilética, sendo subdividida em 4 subfamílias: Etoplinae (Índia e Madagascar), Ptychochrominae (Madagascar), Cichlinae (região neotropical) e Pseudocrenilabrinae (África). Os ciclídeos africanos e neotropicais são considerados monofiléticos e grupos irmãos (SPARKS et al., 2004). A subfamília Cichlinae, representada pelos ciclídeos neotropicais, possui uma filogenia com base em dados moleculares, adotando 7 tribos: Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini, Heroini (SMITH et al., 2008). A representatividade da tribo Geophagini é restrita a América do Sul e sul do Panamá, inclui cerca de 18 gêneros e 250 espécies (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2005a; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2005b). Nesta tribo encontra-se o gênero *Crenicichla*, o mais rico em número de espécies entre os ciclídeos neotropicais.

O interesse pelos ciclídeos como objeto de estudo vem crescendo ao longo dos anos, principalmente devido sua rápida radiação adaptativa, o que os torna modelos para estudos evolutivos (GENNER et al. 2007; FERREIRA et al. 2010).

1. 2. O GÊNERO *Crenicichla*

O gênero *Crenicichla*, pertencente à subfamília Cichlinae e à tribo Geophagini, é considerado o maior entre os ciclídeos neotropicais com 86 espécies válidas (KULLANDER, 2003; CASCIOTTA et al., 2010; PIÁLEK et al., 2010; KULLANDER&LUCENA, 2013). As espécies deste gênero são conhecidas popularmente no Brasil, como “Jacundás”, “joaninhas” e “peixes-sabão”. Sua ampla distribuição abrange quase todas as bacias hidrográficas a leste da cordilheira dos Andes, desde as drenagens costeiras da Venezuela e Guianas até o rio da Prata na Argentina (KULLANDER, 1982). Este gênero apresenta uma grande variação morfológica e variados graus de especialização para cada ambiente (corredeiras, lagos, remansos, cachoeiras, etc.) e devido a sua presença nos mais diversos ambientes tornou-se importante fonte de alimento para algumas comunidades indígenas da Amazônia brasileira (VARELLA et al., 2012).

A posição filogenética de *Crenicichla* dentro de Cichlidae é bastante discutida. Segundo Stiassny (1991) e Kullander (1998) este gênero é irmão de *Cicha* BLOCH & SCHNEIDER 1801, constituindo a subfamília Cichlinae. Posteriormente, após a revisão de López-Fernández et al. (2010) *Crenicichla* foi mantido na subfamília Cichlinae, porém, incluído na tribo Gephagini. A taxonomia das espécies deste gênero é de difícil descrição, principalmente devido a grande semelhança entre si, especialmente entre os juvenis.

Neste estudo serão abordadas as espécies *C. saxatilis*, *C. johanna*, *C. regani* e uma quarta espécie da Amazônia ainda não descrita na literatura, porém referida como *Crenicichla* sp. “Xingu I” (Figura 2, A-D). As características destas espécies serão detalhadas a seguir:

- *Crenicichla saxatilis* (Linnaeus, 1758): Muitas vezes encontrado em riachos, mas às vezes capturado em rios, principalmente durante a estação seca. Alimenta-se basicamente de insetos aquáticos, peixes e material vegetal. Não é muito popular entre os aquaristas devido seu comportamento agressivo; possui comprimento máximo de 20 cm. Distribuição: Drenagens da costa atlântica do Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela e Trinidad (KULLANDER et al., 1989; BOUJARD, 1997).
- *Crenicichla johanna* (HECKEL, 1840): Corpo alongado com coloração cinza amarronzada, e escamas tipicamente lisas. A parte superior da nadadeira dorsal apresenta uma faixa estreita escura contrastando com sua base mais clara e avermelhada. Alcança aproximadamente 35 cm de comprimento quando adulto e é uma das espécies de *Crenicichla* com maior porte e representatividade na pesca comercial do baixo rio Tocantins (SANTOS et al., 1984).

- *Crenicichla regani* (PLOEG, 1989): Possuem comportamento pacífico. O único sinal de agressividade é entre os membros da mesma espécie na manutenção das hierarquias, mas sem grandes consequências. Se alimenta de larvas, insetos e pequenos peixes. O dimorfismo sexual pode ser determinado pela diferença de tamanho, onde o macho adulto possui cerca de 14 Cm e a fêmea 10 cm. Além disso, a nadadeira dorsal da fêmea apresenta um ou mais ocelos, enquanto o macho não os apresenta. Distribuição: Bacia do Rio Amazonas, no rio Trombetas em Cachoeira Porteira. (MONTEIRO, 2011; KULLANDER, 2003).
- *Crenicichla* sp. “Xingu I” (não descrito): Está espécie não possui taxonomia definida cientificamente e a classificação “Xingu I” foi atribuída pela indústria do aquarismo como meio de identificar os indivíduos desta espécie pertencente ao rio Xingu. Estes animais possuem em média 30 cm, são piscívoros e bastante agressivos. O dimorfismo sexual é determinado pelo tamanho do animal, onde o macho é bem maior que a fêmea. (retirado de aquahobby.com).

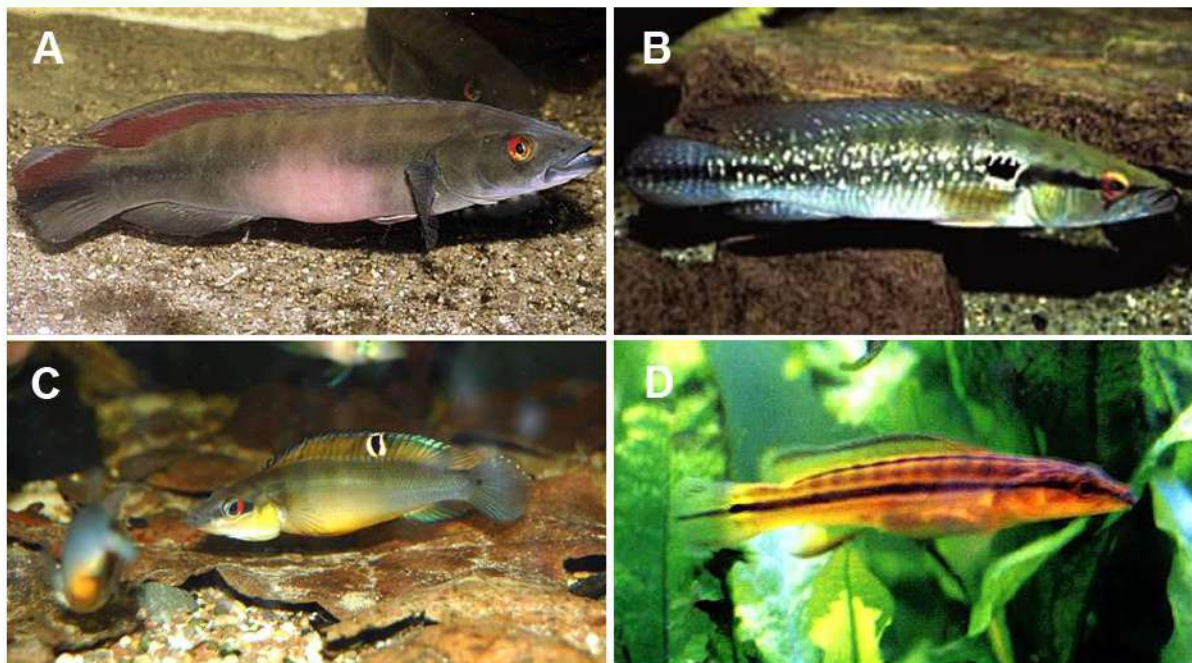


Figura 2: Espécies analisadas no presente estudo. (A) *Crenicichla johanna*, (B) *Crenicichla saxatilis*, (C) *Crenicichla regani*, (D) *Crenicichla* sp. “Xingu I”. (Retirado de: www.ciclideos.com; www.fishbase.com)

1.2.1. Citogenética de Cichlidae com enfoque em *Crenicichla*

Levando em conta a riqueza de espécies de Cichlidae, pode-se considerar que a quantidade de trabalhos voltados para o estudo cariotípico desta família ainda é pequena (ARAI, 2011). No entanto, alguns padrões cariotípicos são bem claros. Nas espécies africanas o número diplóide mais comumente encontrado é $2n=44$, enquanto que, nas espécies neotropicais o número diplóide é predominantemente $2n=48$ (Arai 2011), corroborando a teoria proposta por Feldberg et al. (2003), que considera três tendências de evolução cariotípica para esta família a partir de um cariótipo ancestral com 48 cromossomos acrocêntricos: (1) manutenção do $2n=48$, com o surgimento de alguns cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos devido inversões pericêntricas, como observado nos ciclídeos neotropicais, (2) diminuição do $2n$ devido a ocorrência de fusões cêntricas entre cromossomos acrocêntricos ou (3) aumento do $2n$ devido a processos de inversões pericêntricas sucedidos por fissões cêntricas. Essas tendências explicam a variação de $2n=32$ a $2n=60$ em Cichlidae (ARAI, 2011).

Mesmo existindo poucos estudos sobre a citogenética de *Crenicichla*, é possível observar alguns padrões importantes para esse grupo, como a alta conservação do $2n=48$, observado em todas as espécies estudadas atualmente (Arai 2011) (Tabela 1). O número fundamental varia entre $NF=52$ em *Crenicichla saxatilis* (OYHENART-PERERA et al., 1975) e $NF=62$ em *Crenicichla niederleinii* (MARTINS et al. 1995). Até o presente momento nenhuma espécie de *Crenicichla* apresentou cromossomos sexuais heteromórficos.

A heterocromatina constitutiva (HC) é observada, em geral, na região pericentromérica das espécies deste gênero, com algumas apresentando HC na região terminal de alguns cromossomos (BENZAQUEM et al., 2008; MIZOGUCHI et al., 2007). Além disso, algumas destas podem apresentar regiões heterocromáticas intersticiais como observado em *Crenicichla lepidota* (Perazzo et al. 2011).

Alguns trabalhos buscaram explorar o funcionamento de mecanismos epigenéticos deste grupo como em *Crenicichla reticulata* (Feldberg et al. 2004) e em *Crenicichla lepidota* (PIRES et al., 2015) onde analisou-se a ocorrência e frequência de cromossomos supranumerários; estas análises sugeriram que a baixa frequência de cromossomos B em *Crenicichla* indica uma origem recente desses cromossomos neste grupo e que o surgimento destes é decorrente de condições ambientais adversas.

Estudos têm mostrado, que DNA repetitivo está envolvido na organização estrutural e funcional do genoma, agindo na regulação gênica, replicação, reparo de DNA, podendo também influenciar fortemente no processo evolutivo de seu hospedeiro, pois a movimentação destes elementos pode promover mudanças estruturais que levariam a eventos como: rearranjos

Tabela 1: Dados citogenéticos de <i>Crenicichla</i> , adaptado de Araújo (2011).	Espécies	2n	Fórmula Cariotípica	Localidade	Referencia
	<i>Crenicichla britskii</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Bacia Paraná-Paraguai	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla cincta</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Brasil (AM)	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla iguassuensis</i>	48	2M + 6SM + 14ST +26A	Brasil (PR)	Mizoguchi et al. (2007)
	<i>Crenicichla iguassuensis</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (PR)	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla inpa</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (Bacia amazônica)	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Bragança, PA, Brasil	Neste trabalho
	<i>Crenicichla johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Cametá, PA, Brasil	Neste trabalho
	<i>Crenicichla cf. johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Brasil (Bacia amazônica)	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla lacustris</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (SP)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
	<i>Crenicichla lepidota</i>	48	6M/SM + 8ST + 34A	América do Sul	Thompson (1979)
	<i>Crenicichla lepidota</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (MS)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
	<i>Crenicichla lepidota</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Argentina	Fenocchio et al. (2003), Roncati et al. (2007)
	<i>Crenicichla lepidota</i>	48	2M + 4SM + 6ST + 36A	Brasil (PR)	Martins et al. (1995)
	<i>Crenicichla lucius</i>	48		Rio Amazonas	Thompson (1979)
	<i>Crenicichla lugubris</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Brasil (Bacia amazônica)	Benzaquem et al. (2008)
	<i>Crenicichla niederleinii</i>	48	2M + 12SM + 4ST + 30A	Brasil (PR)	Martins et al. (1995)
	<i>Crenicichla niederleinii</i>	48	2M + 8SM + 38 ST/A	Brasil (PR)	Lorerio et al. (2000)
	<i>Crenicichla niederleinii</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Argentina	Fenocchio et al. (2003), Roncati et al. (2007)
	<i>Crenicichla notophthalmus</i>	48	6M/SM + 8ST + 34A	Rio Amazonas	Thompson (1979)
	<i>Crenicichla regani</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Jejú, PA, Brasil	Neste trabalho
	<i>Crenicichla reticulata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (Rio Amazonas)	Benzaquem et al. (2008), Feldberg et al. (2004)
	<i>Crenicichla saxatilis</i>	48	4M + 44A	América do Sul	Oyhenart-Perera et al. (1975), Hinegardner & Rosen (1972)
	<i>Crenicichla saxatilis</i>	48	8M/SM+ 40 ST/A	Bragança, PA, Brasil	Neste trabalho
	<i>Crenicichla semifasciata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Argentina	Fenocchio et al. (2003)
	<i>Crenicichla semifasciata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (MS)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
	<i>Crenicichla strigata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Rio Amazonas	Thompson (1979)
	<i>Crenicichla vittata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brasil (MS)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
	<i>Crenicichla sp.</i>	48	2M + 6SM + 40ST/A	Brasil (SC)	Lorerio et al. (2000)
	<i>Crenicichla sp. "Xingu I"</i>	48	48ST/A	Altamira, PA, Brasil	Neste trabalho

cromossômicos, modificações nos padrões de regulação gênica, além da geração de variabilidade genética, tendo um papel fundamental na evolução dos genes e na estrutura genômica dos eucariotos (FESCHOTTE & PRITHAM, 2007).

No genoma de peixes normalmente tem se encontrado todos os tipos de elementos transponíveis conhecidos, e alguns desses elementos já foram mapeados nos cromossomos. Entre os diversos elementos móveis encontram-se os da família *Rex* (*Rex1*, *Rex3* e *Rex6*) e *Mariner*, que se mostram bastante abundantes em Teleósteos (VOLFF et al., 2000; CIOFFI & BERTOLLO, 2012; VOLTOLIN et al. 2013), no entanto, nenhuma análise com esses transposons foi feita em espécies de *Crenicichla*.

Estudos sobre a organização genômica de DNAs repetitivos em *Crenicichla* ainda são escassos e limitados a análise de rDNA 18S e rDNA 5S em *C. lepidota* (PERAZZO et al., 2011; PIRES et al., 2015). Nesta espécie, o rDNA 18S está localizado na constrição secundária presente no braço curto do par 1, enquanto o 5S rDNA na região intersticial de dois pares acrocêntricos.

Crenicichla, é o gênero mais rico entre os ciclídeos neotropicais. Devido a grande variação morfológica das espécies, suas adaptações associadas a hábitos alimentares e suas mudanças de coloração no período de intensa atividade reprodutiva é considerado um dos mais complexos do ponto de vista taxonômico. Portanto, o mapeamento de sequências de DNAs repetitivos contribui como importante marcador citotaxonômico, além de auxiliar no estudo evolutivo do cariótipo desses animais.

Neste trabalho comparamos, por dados citogenéticos, quatro espécies amazônicas de *Crenicichla*, a fim de investigar os prováveis mecanismos envolvidos na evolução cromossômica, bem como, analisar a organização genômica do DNA repetitivo neste gênero.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar citogeneticamente as espécies *Crenicichla johanna*, *Crenicichla saxatilis*, *Crenicichla regani* e *Crenicichla* sp. “Xingu I” buscando contribuir com a citotaxonomia das espécies e no entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica do gênero.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar citogeneticamente as espécies *Crenicichla johanna*, *Crenicichla saxatilis*, *Crenicichla regani* e *Crenicichla* sp. “Xingu I”, buscando fornecer marcadores citotaxonômicos para o grupo.
- b. Estabelecer e comparar os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva entre as espécies de *Crenicichla*;
- c. Inferir a ocorrência de rearranjos cromossômicos a partir do mapeamento de sequencias teloméricas e rDNAs.
- d. Identificar os sítios de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) ativos nas espécies de *Crenicichla* estudadas;
- e. Analisar a distribuição dos elementos transponíveis *Mariner* e *Rex1*, e propor possíveis mecanismos da atuação destes no genoma das espécies de *Crenicichla* estudadas.
- g. Fazer uma análise cariotípica comparativa interespecífica dos resultados obtidos, como os dados citogenéticos disponíveis na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

As amostras utilizadas no presente estudo foram compostas de: 13 espécimes de *Crenicichla johanna*, sendo 2 machos, 2 fêmeas e 3 juvenis provenientes do município de Abaetetuba e 2 machos, 1 fêmea e 3 juvenis do município de Cametá, Pará, Brasil; 3 machos e 2 fêmeas e 1 juvenil de *Crenicichla saxatilis* provenientes do município de Bragança, Pará, Brasil; 1 macho de *Crenicichla regani* proveniente do município de Jeju, Pará, Brasil; 8 machos e 1 juvenil de *Crenicichla* sp. Xingu I (Figura 3). A identificação taxonômica das espécies foi determinada segundo Vieira et al. (2016) e a partir de classificação comercial para *Crenicichla* sp. “Xingu I”. Os espécimes foram tombados na coleção do Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade - Laboratório de Citogenética, UFPA.

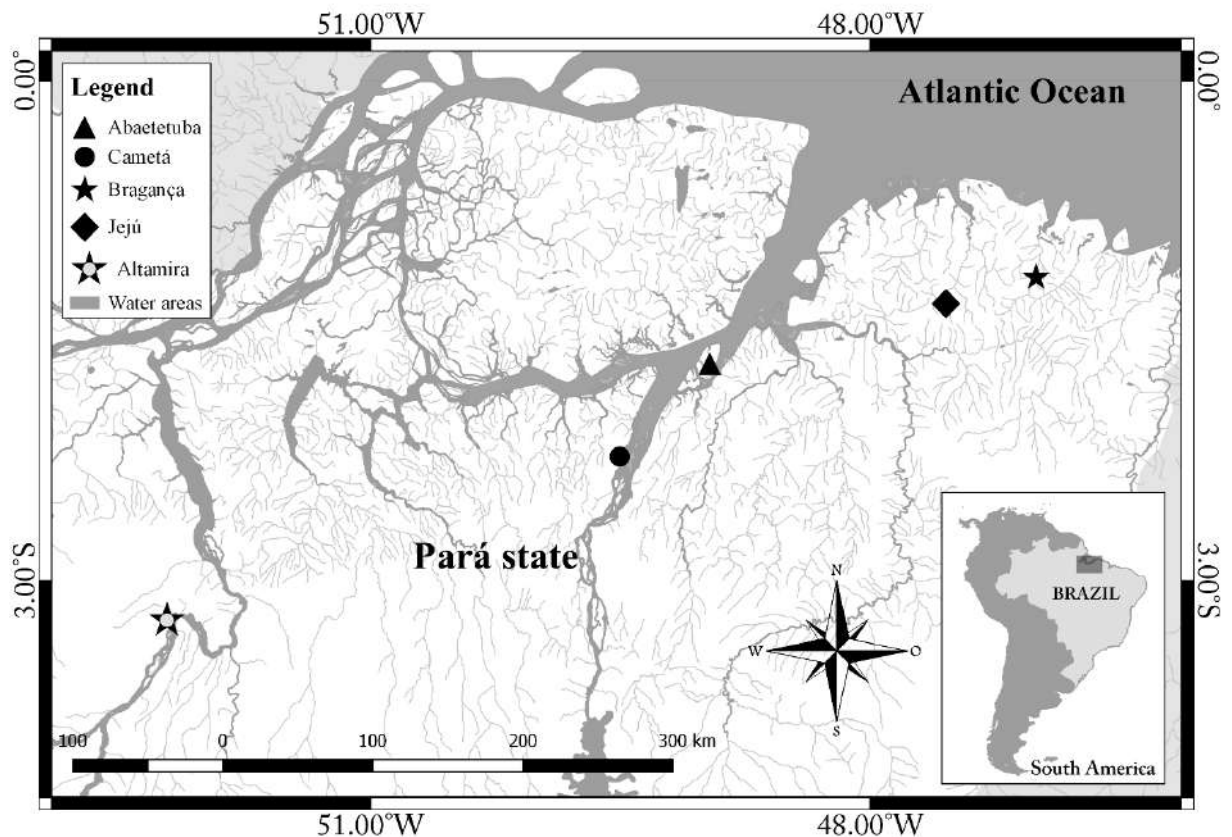


Figura 3: Mapa indicando os pontos de coleta das espécies estudadas. Todas localizadas no estado do Pará, Brasil.

4.2. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim cefálico e caudal dos peixes. A metodologia utilizada foi proposta por Bertollo et al. (1978), com modificações. Injetou-se solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/ 100 g de peso do animal, na região dorso-lateral dos animais com o auxílio de uma seringa de insulina; posteriormente os animais foram mantidos em aquário aerado por 30 minutos e em seguida eutanasiado para a retirada do rim cefálico. O rim extraído foi colocado em solução hipotônica de KCl 0,075 M e, com o auxílio de pinça e tesoura, foi cortado em pedaços menores, e dissociado com um macerador de vidro. Em seguida, o material foi levado a estufa a 37°C por 30 minutos. Ao sair da estufa, partes dos tecidos que não foram completamente dissociados foram retirados com auxílio de pinça. Acrescentou-se 1 mL de fixador Carnoy (3 partes de Metanol e 1 parte de Ácido Acético), e o material foi ressuspensionado em placa de petri e transferido para tubos de centrífuga, com auxílio de pipeta Pasteur. O material transferido para os tubos foi centrifugado a 1000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e novamente adicionou-se fixador Carnoy (5-10 mL). O material foi ressuspensionado e armazenado em freezer -20 °C.

4.3. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan et al. (1964). Para cálculo do Número Fundamental de braços (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos e submetacêntricos foram considerados de dois braços, enquanto os subtelo-cêntricos e acrocêntricos foram considerados de um braço.

4.4. TÉCNICA DE BANDEAMENTO C

A detecção da heterocromatina constitutiva dos cromossomos foi realizada segundo Sumner (1972). Inicialmente, a lâmina foi tratada com Ácido Clorídrico (HCl) 0,2 N em temperatura ambiente (~27°C) por 15 minutos, em seguida lavada com água destilada e seca ao ar. A lâmina foi incubada em solução aquosa de Hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) 6%, à 60 °C, durante 20-30 segundos. Após isso, a lâmina foi imediatamente imersa em HCl 0,1 à 60 °C para interrupção da ação da solução de Hidróxido de Bário, lavada com água destilada e posta para secar ao ar. A lâmina foi novamente incubada em solução salina 2xSSC a 60 °C por 15 minutos e posteriormente lavada com água destilada e deixada para secar ao ar. Posteriormente, foi feita a coloração da lâmina com solução de Giemsa, diluída em tampão fosfato pH 6,8 na proporção de 3 mL de tampão e 0,5 mL de solução de Giemsa, por 10 minutos.

4.5. TÉCNICA DE COLORAÇÃO POR AgNOR

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foram detectadas por impregnação de Nitrato de Prata, segundo a técnica descrita por Howell & Black (1980) com modificações. Primeiramente, a lâmina foi tratada em HCl 0,2 N durante 3 minutos em temperatura ambiente (~27°C) e lavada com água destilada e deixada para secar. Em seguida, colocou-se sobre a lâmina uma gota de solução aquosa de gelatina e duas gotas de solução aquosa de Nitrato de Prata (AgNO_3); em seguida, cobriu-se com lamínula 24 x 50 mm, deixando a lamínula para baixo, em câmara escura e úmida em banho-maria 60 °C por 7-9 minutos; posteriormente a lâmina foi lavada com jatos de água para remover a lamínula e todo o excesso dos reagentes, e deixada para secar ao ar. A técnica de coloração foi feita com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção 3:1 durante 1 minuto.

4.6. MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE DNA REPETITIVO

4.6.1. Isolamento de sequências repetitivas

O DNA genômico de um indivíduo de *Crenicichla johanna* foi extraído através do GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sequências utilizadas na produção de sondas para análise FISH foram amplificadas por PCR com o seguinte conjunto de primers: rDNA 18S (18SF-5' CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT e 18SR-5' CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA); rDNA 5S (5SF-5' GCC ACA CCA CCC CTG AAC AC e 5SR-5' GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC); sequências teloméricas (TTAGGG e CCCTAA). O isolamento dos elementos transponíveis *Mariner* e *Rex1* foi realizado segundo Lampe et al. (2003) e Volff et al. (2000) respectivamente.

4.6.2. Nick-translation

As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina-14-dATP ou digoxigenina-11-dUTP (Kit Dig-Nick, Roche, EUA). Em um tubo de volume 0,25µL foram adicionados 1µL de DNA (concentração de 1000ng/µL), 4µL de mix de reação e 15µL de água. A reação ocorreu a 15°C por 90 minutos. Após isso, foi adicionado 1µL de *stop buffer* para parar a reação.

4.6.3. Hibridização *in situ* fluorescente

Análise de FISH foi realizada segundo Pinkel et al. (1986). As lâminas foram tratadas com solução de RNase (0,5 µL de RNase diluído em 200 µL de 4xSSC Tween), colocando-se 200µL da solução de RNase sobre cada lâmina, cobrindo-as com lamínula plástica, e encubando-as por 20 minutos em câmara húmida a 37°C. Em seguida, lâminas foram mergulhadas em solução de Pepsina 1% a temperatura ambiente (~27°C) por 10 minutos. Após isso, desidratadas em bateria de álcool como segue: duas vezes em álcool 70% por 2 minutos em cada, duas vezes em álcool 90% por 2 minutos em cada e uma vez em álcool 100% por 4 minutos.

A solução de hibridização é composta de 2µL de sonda, formamida 50%, 2SSC e sulfato dextrano, e foi desnaturada a 70°C. A desnaturação do DNA cromossômico foi realizada em formamida 70% a 65°C no intervalo de tempo de 20-40 segundos. Após a desnaturação, a solução de hibridização foi colocada sobre a região das metáfases na lâmina e em seguida colocou-se uma lamínula de vidro que foi selada. A hibridização ocorreu em câmara úmida em estufa a 37°C durante 24h. As sondas foram detectadas com avidina-CY3 ou antidigoxigenina-FITC. Os cromossomos foram contracorados com DAPI, contendo antifading Vectashield.

4.6.4 *Fiber-FISH*

O *fiber-FISH* foi realizado segundo Barros et al. (2011). As lâminas usadas para o *fiber-FISH* foram pré-tratadas com PBS 1x por 2 minutos, em seguida lavadas em água destilada e postas para secar a temperatura ambiente (~27°C). Após isso, as lâminas foram desidratadas em bateria de álcool como segue: 5 minutos em álcool 70%, 5 minutos em álcool 85% e 5 minutos em álcool 100%. Colocou-se sobre a base da lâmina 300µL de uma solução de NaOH 0.15M (300µL de NaOH 0.5M diluído em 700µL de álcool 30%) e com o auxílio de uma segunda lâmina foi feito o esfregaço sobre o material citológico, de forma que as fibras nos núcleos interfásicos fossem arrastadas e esticadas mecanicamente. Após isso, as lâminas foram postas em posição inclinada e sobre ela se colocou 500µL de álcool 100%. Em seguida realizou-se a FISH.

4.7. ANÁLISE DE IMAGENS

As lâminas contendo as preparações cromossômicas, utilizadas para as técnicas de citogenética clássica, foram analisadas em microscópio Olympus BX41 e fotografadas com câmera digital Cânon Powershot A95. Os cariótipos foram montados com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.

As imagens de FISH foram capturadas por uma câmera CCD AxioCam MRm (Nikon) acopladas ao microscópio de Epifluorescência Nikon H550S (Nikon). A captura das imagens foi intermediada pelo programa Nis-Elements (Nikon). A edição das imagens (ajuste de brilho e contraste, montagem do cariótipo etc.) foi feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.

5. RESULTADOS

Todas as espécies estudadas no presente estudo apresentaram número diploide $2n=48$ (Figura 4). Os indivíduos de *C. johanna*, *C. saxatilis* e *C. regani* apresentam número fundamental (NF) igual a 56, e fórmula cariotípica 8M/SM e 40ST/A (Figura 4 - A, C, E, G). *Crenicichla* sp. “Xingu I” diferiu destas, pois apresentou NF= 48 e fórmula cariotípica 48ST/A (Figura 4 - I).

Nas quatro espécies analisadas, o bandeamento C revelou heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos cromossomos. Em *C. johanna*, a população de Abaetetuba (AB) apresentou bandas C adicionais nas regiões terminais na maioria dos cromossomos (Figura 4 - B); o mesmo padrão foi observado na população de Cametá (CA), porém nesta também se observou heterocromatina ao longo de todo o braço curto do par 2, apresentando heteromorfismo de tamanho entre os homólogos (Figura 4 - D); em *C. saxatilis*, a região terminal de grande parte dos pares do cariótipo é heterocromática, bem como a constrição secundária do par 1 (Figura 4 - F); em *Crenicichla regani* foi observado heterocromatina na região intersticial dos pares 6, 7, 11 e 22 (Figura 4 - H); *Crenicichla* sp. “Xingu I” bandas C intersticiais foram observadas em alguns pares, além de várias marcações difusas (Figura 4 - J).

A coloração por AgNOR mostrou que apenas um par de cromossomos possui sítios 18S rDNA ativos no cariótipo de todas as espécies estudadas.

Diferentes marcações da sonda rDNA 18S foram observadas. Nas duas populações de *C. johanna* registramos uma variação na quantidade de sítios de rDNA 18S: AB com *clusters* em 6 cromossomos, além de sítios menores de rDNA 18S na região terminal de vários cromossomos (Figura 5 - A); enquanto, CA demonstrou *clusters* localizados no braço curto do par 2 e na região terminal de um dos homólogos de um par acrocêntrico (Figura 5 - B); em *C. saxatilis* o rDNA 18S localiza-se na constrição secundária no braço curto do par 1 (Figura 5 - C); em *C. regani* esta sequência foi encontrada ao longo do braço curto do par 1 (Figura 5 - D); e em *Crenicichla* sp. “Xingu I” está localizado na região terminal de um par acrocêntrico (Figura 5 - E).

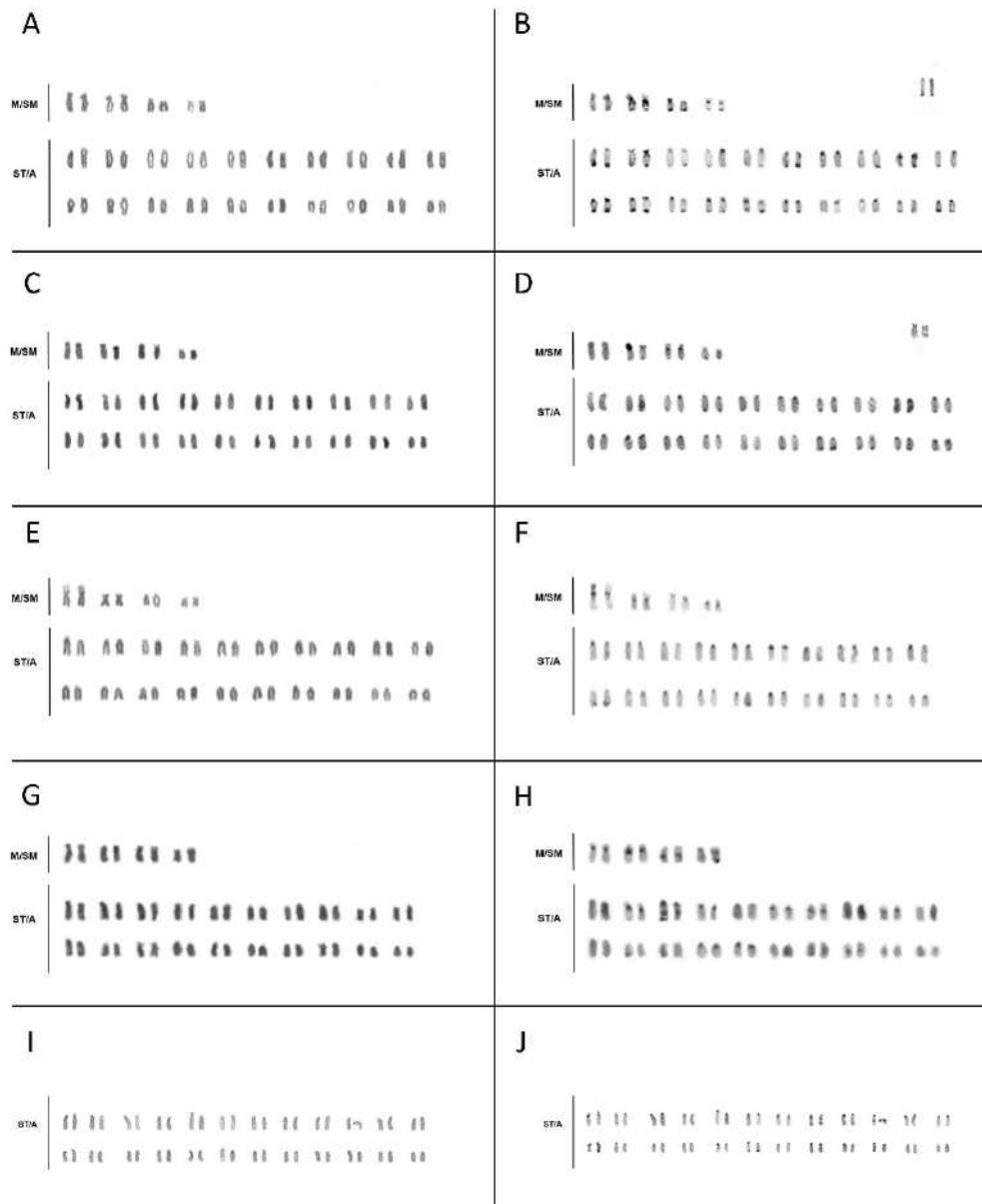


Figura 4: Cariótipos corados com Giemsa 5% e com bandeamento C de: *C. johanna* AB (A e B) com AgNOR em destaque, *C. johanna* AC (C e D) com AgNOR em destaque, *C. saxatilis* (E e F), *C. regani* (G e H) e *Crenicichla* sp. "Xingu I" (I e J).

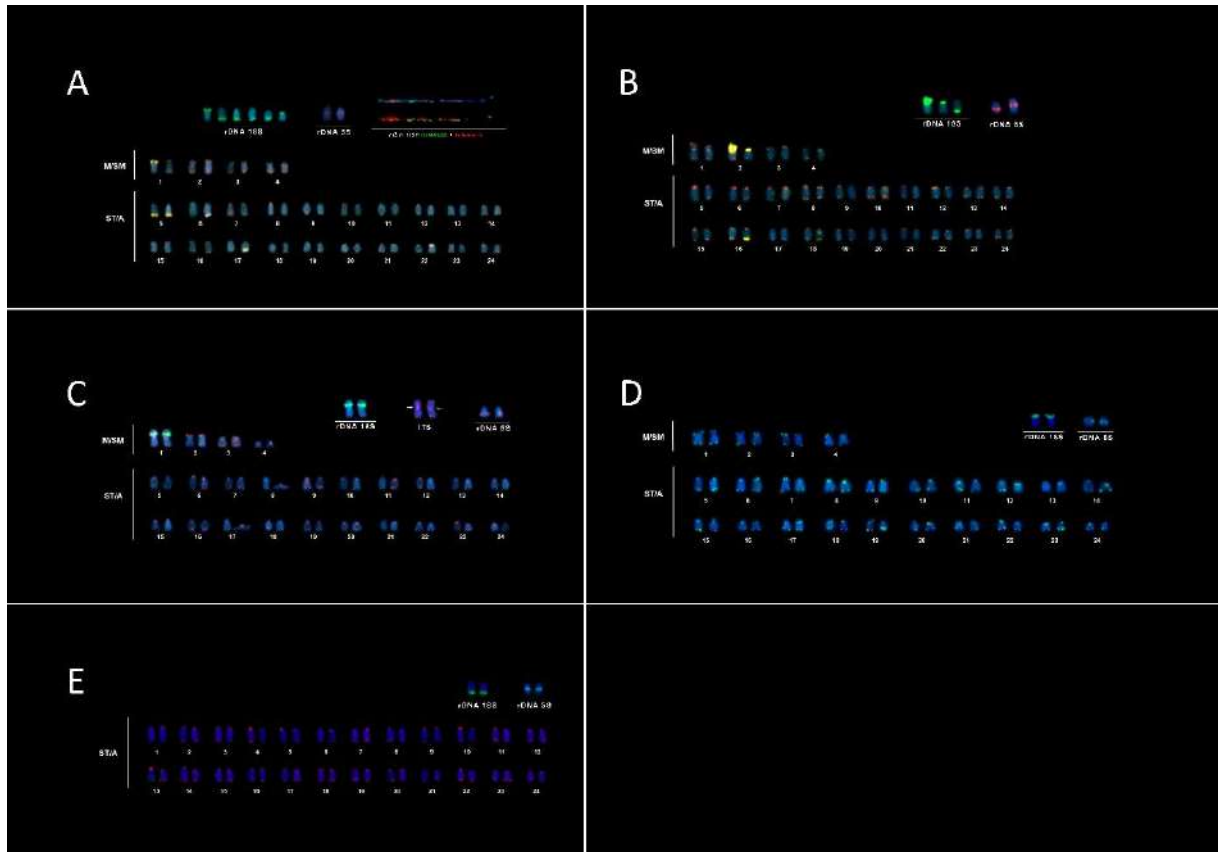


Figura 5: FISH com sondas teloméricas (vermelho) e rDNA 18S (verde) em (A) *C. johanna* AB, em destaque sítios de rDNA 18S, rDNA 5S e *Fiber-FISH* respectivamente; (B) em *C. johanna* CA, em destaque sítios de rDNA 18S e rDNA 5S respectivamente; (C) em *C. saxatilis*, em destaque rDNA 18S, marcação telomérica intersticial (ITS) e rDNA 5S respectivamente; (D) em *C. regani*, em destaque rDNA 18S e rDNA 5S respectivamente; (E) em *Crenicichla* sp. “Xungu I”, em destaque rDNA 18S e rDNA 5S respectivamente.

Em relação ao 5S rDNA, em todas as espécies esta sequência foi observada na região intersticial de um par acrocêntrico (Figura 5 – A-E).

Nas quatro espécies analisadas, FISH com sonda telomérica evidenciou marcações na região distal de todos os cromossomos. Entretanto, sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram visualizadas formando *clusters* em *C. johanna*, sendo 6 *clusters* em AB e 3 em CA, todos possuindo localização sintênica com as sequências de rDNA 18S em ambas as populações (Figura 5 A e B); *C. saxatilis* apresentou sequências teloméricas intersticiais (ITS) na região centromérica do par 1. A análise do *fiber-FISH* revelou que as sequências teloméricas-18S rDNA com localização sintênica estão dispostas de forma intercalada.

Os elementos de transposição (TEs) TC1-*Mariner* e *RexI* apresentaram distribuição dispersa no cariótipo das espécies hibridizadas por essas sequências (Figura 6 e 7). No entanto, em *C. saxatilis* foi possível observar uma marcação adicional do transposon *Mariner* sintênica ao rDNA 18S na constrição secundária do par 1 (Figura 6 - C).

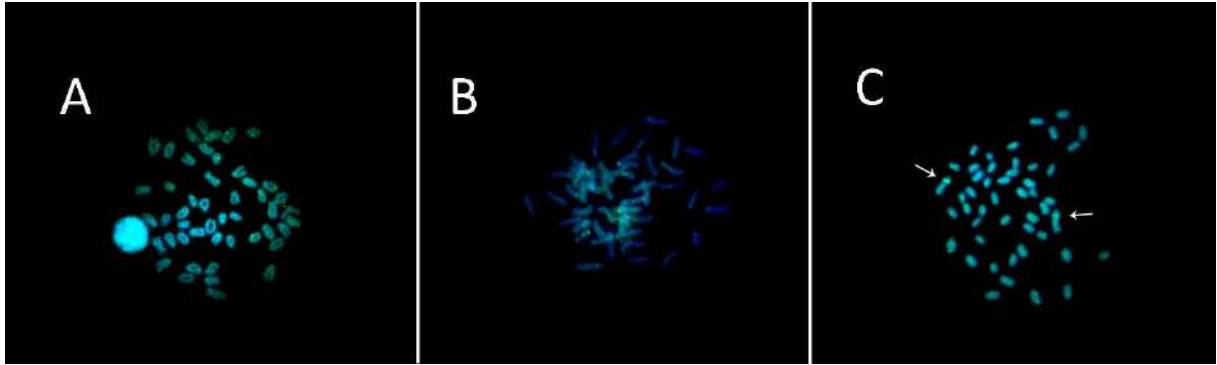


Figura 6: FISH com sonda *Mariner* em metáfase de : (A) *C. johanna* AB; (B) *C. johanna* CA e (C) *C. saxatilis*. As setas apontam o *cluster* formado na constrição secundária do par 1 observado em *C. saxatilis*.

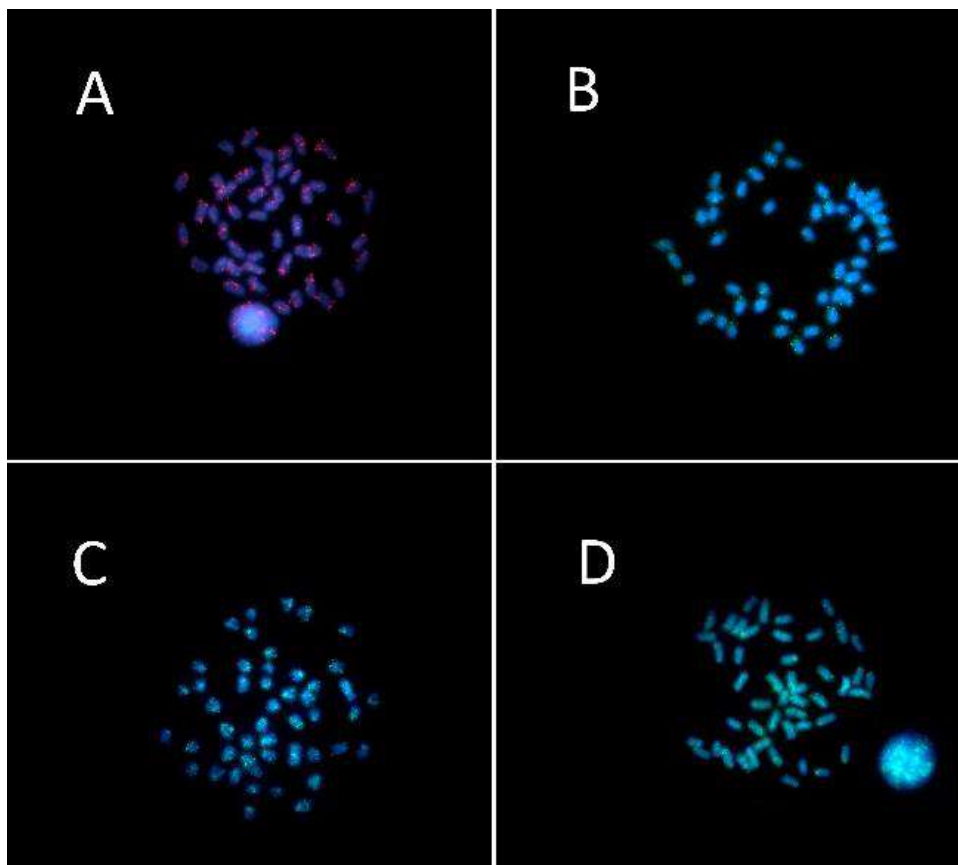


Figura 7: FISH com sonda de *RexI* em metáfase de: (A) *C. johanna* AB; (B) *C. johanna* CA; (C) *C. saxatilis* e (D) *Crenicichla* sp. “Xingu I”

6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, o número diplóide manteve-se conservado nas quatro espécies analisadas de *Crenicichla*, corroborando dados da literatura onde, segundo Arai (2011), mais de 75% das espécies da subfamília Cichlinae estudadas apresentam $2n=48$.

Os cariótipos de *C. regani* e *Crenicichla* sp. Xingu I foram descritos pela primeira vez nesse trabalho (Figura 4 - G e I). *C. johanna* apresentou o mesmo NF observado por Benzaquem et al. (2008) para uma população de Catalão, AM, Brasil. Por outro lado, o número fundamental observado em *C. saxatilis* no presente trabalho (NF=56), diverge com relação ao já descrito por Oyhenart-Perera et al. (1975), que observou NF=52; essa divergência pode ser resultante de processos de inversões em dois pares acrocêntricos. Essa hipótese é corroborada pela conservação do NF e pala ITS observada no par 1 desta espécie. Alternativamente, a mudança na morfologia destes cromossomos pode ser explicada por reposicionamento centromérico (Lomiento et al. 2008), e a ITS, por hibridização inespecífica da sonda telomérica, que têm afinidade com regiões repetitivas (Noronha et al. 2016).

Feldberg et al. (2003), sugerem que, o cariótipo ancestral para Cichlidae seja composto por 48 cromossomos acrocêntricos, onde os cariótipos dos ciclídeos neotropicais derivados apresentam uma reorganização cromossômica, possuindo cromossomos metacêntricos e/ou submetacêntricos. Em nossas análises, *Crenicichla* sp. “Xingu I” apresentou $2n=48$ e NF=48, similar ao proposto por Feldberg et al. (2003). Esse cariótipo é único entre os integrantes do gênero *Crenicichla*, uma vez que as demais espécies comumente apresentam cromossomos de dois braços (Arai 2011). Esse dado pode ser explicado por: (1) reversão aos caracteres ancestrais através da ocorrência de inversões cromossômicas, tornando cromossomos metacêntricos/submetacêntricos em acrocêntricos (homoplasia); (2) manutenção do cariótipo considerado basal para esta família (simplesiomorfia).

Nas quatro espécies analisadas a heterocromatina foi observada na região centromérica, com alguns sítios menores na região terminal dos cromossomos. No entanto *C. johanna* CA apresentou o braço curto do par 2 completamente heterocromático e com dimorfismo de tamanho entre os homólogos, isto pode ser resultado de um processo de amplificação da heterocromatina (MARGARIDO & GALETTI-JUNIOR, 2000), com subsequente formação do heteromorfismo deste par através de translocações simples ou crossing-over desigual (Schneider et al. 2013).

A distribuição do rDNA 18S em 6 cromossomos, observada no cariótipo dos indivíduos de *C. johanna* AB e em 3 cromossomos nos indivíduos *C. johanna* CA difere das

demais espécies analisadas neste trabalho e de *Crenicichla lepidota* (Perazzo et al. 2011) que apresentam marcação simples. Esta variabilidade registrada em *C. johanna* pode ser explicada por: a) recombinação ectópica, decorrente da aproximação física entre os cromossomos no período da intérfase ou prófase meiótica, quando estes podem apresentar distribuição *bouque/Rab1*, com seus telômeros bastante próximos e ligados a membrana nuclear (Montgomery et al. 1991); b) translocações, tendo em vista que regiões heterocromáticas e regiões ricas em rDNA são locais propícios a quebras cromossômicas (Rousselet et al. 2000). Acreditamos que as pequenas marcações de rDNA 18S podem estar associadas com DNAs satélites, como observado em *Astyanax janae* (Vicari et al. 2008).

Apesar da grande variabilidade de sítios 18S rDNA, apenas se observou uma NOR ativa em todas as espécies. Os cromossomos portadores da NOR nas populações de *C. johanna* do presente estudo diferem daqueles observados por Benzaquem et al., (2008) em uma população do rio Catalão no estado do Amazonas, em que o braço curto do par 24 é portador da NOR ativa. Essa diferença no sítio de rDNA expresso entre as populações de *C. johanna*, pode ser resultado de uma competição entre alguns cromossomos nucleolares com menor ou maior capacidade de sintetizar ou organizar pequenos e grandes nucléolos (RAMIREZ & SINCLAIR, 1975), demonstrando que o sítio rDNA 18S ativo pode variar entre populações de *C. johanna*. Outra explicação para a presença de um único par portador da NOR ativa e para a diferença observada descrita acima, seria o silenciamento aleatório dos sítios de rDNA devido a ação de outros DNAs repetitivos como observado por Vicari et al. (2008) para o DNA satélite As51.

A colocalização das sequências teloméricas e rDNA18S sugerem a ocorrência de várias ITSS interespaçadas com sequências da NOR, como proposto por Salvadori et al. (1995) para *Anguilla anguilla* e *A. rostrata*. A associação de sequências rDNA e teloméricas tem sido observada, também, em plantas (Souza et al. 2016) e em peixes (Ocalewicz 2013). A origem e função das sequências teloméricas colocalizadas com sequências de rDNA não são claras. As repetições teloméricas colocalizadas ao rDNA são considerados “hot spots” de recombinação podendo aumentar a taxa de quebras cromossômicas e rearranjos; por outro lado, o rDNA intercalado com as sequências teloméricas podem estabilizar as extremidades cromossômicas quebradas (Ocalewicz 2013). Ao levarmos em consideração a teoria proposta por Felfberg et al. (2003) para o ciclídeos neotropicais, onde estes sofreriam inversões pericêntricas gerando cromossomos M/SM, associado a presença de sequências teloméricas intersticiais em pares metacêntricos, que podem significar pontos de recombinação recentes, acreditamos que a

associação de sequências rDNA e telomérica esteja mais associada a “hot spots” de recombinação.

A localização do rDNA 5S na região intersticial de um par acrocêntrico, observada nas quatro espécies, está de acordo com o padrão descrito na literatura para Cichlidae e pode representar uma condição ancestral da organização cromossômica dos genes de rDNA 5S (Nakajima et al. 2012). No entanto Perazzo et al. (2011) observaram a presença de 2 pares portadores deste rDNA em *C. lepidota*. Em outras espécies a mobilidade do rDNA 5S tem sido registrada por associação com retroelementos do tipo *Rex* (Cioffi et al., 2012). A diferença na quantidade de sítios rDNA 5S entre as espécies deste estudo e do trabalho de Perazzo et al. (2011) pode ser a presença de pseudogenes como observado por Martins et al. (2002) ou a dispersão das sequências 5S rDNA por associação com elementos de transposição como proposto por Cioffi et al. (2012).

O padrão de distribuição do retroelemento *Rex1* das quatro espécies estudadas assemelhou-se ao observado em *Cichla kelberi* (Teixeira et al. 2009) que apresentou marcações dispersas ao longo dos cromossomos. No entanto, já foram relatados outros padrões de distribuição dessas sequências para peixes. Um estudo feito por Voltolin et al. (2013) relatou um padrão totalmente diferente para 5 espécies pertencentes a ordem dos Characiformes, onde as sequências de *Rex1* marcavam regiões coincidentes com a heterocromatina constitutiva.

O elemento de transposição *Mariner* apresentou distribuição dispersa nas quatro espécies analisadas, sugerindo que esses elementos estão em atividade no genoma. Acreditamos que a marcação adicional em *cluster* do transposon *Mariner* colocalizada com o rDNA 18S em *C. saxatilis*, represente um processo de silenciamento deste elemento transponível mediado por fatores epigenéticos (Pinsker et al. 2001) ocorrendo a migração das sequências desse elemento para uma região heterocromática. Por outro lado, essa colocalização pode gerar mobilidade ao complexo “18S rDNA-*Mariner*”, permitindo a dispersão das sequências ao longo do genoma como proposto por Cioffi et al. (2012) para o complexo “5S rDNA-Rex3”.

7. CONCLUSÕES

- Apesar de apresentar $2n=48$ altamente conservado, as espécies do gênero *Crenicichla* possuem muitas diferenças microestruturais no cariótipo tanto a nível interespecífico quanto intraespecífico.
- O aumento do número fundamental da população de *C. saxatilis* analisada no presente estudo é, provavelmente, resultado do processo de inversões pericêntricas em 2 pares de cromossomos ST/A, mostrando evidências de evolução cariotípica com manutenção do $2n$.
- Em todas as espécies analisadas no presente estudo, observou-se a manutenção do padrão de heterocromatina comumente observado entre as espécies de *Crenicichla*, apresentando marcações adicionais em regiões terminais e intersticiais.
- Nas quatro espécies a NOR observada foi simples; entretanto em *C. johanna* observou-se a presença de sequências de rDNA em até 6 sítios.
- Existe associação de sequências de DNAs repetitivos nas duas populações de *Crenicichla johanna* e em *Crenicichla saxatilis*.
- A espécie *Crenicichla* sp. “Xingu I” apresenta fórmula cariotípica semelhante ao ancestral, por manutenção ou homoplasia.

8. REFERÊNCIAS

- Anon, *Crenicichla* sp. “Xingu I.” Available at: http://www.aquahobby.com/gallery/e_creni.php [Accessed January 5, 2017].
- Arai, R., 2011. *Fish karyotypes: a check list*, Tokyo: Springer.
- Barros, A.V. de et al., 2011. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture*, 322–323(November 2015), pp.47–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.002>.
- Benzaquem, D.C. et al., 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1 SUPPL. 1), pp.250–255.
- Bertollo, L. A. C.; Takahashi, C. S.; Moreira Filho, O., 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplías lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet*, 7, pp.103–120.
- Boujard, T., 1997. Poissons de Guyane : guide écologique de l’Approuague et de la Réserve des Nouragues.
- Casciotta, J. et al., 2010. *Crenicichla ypo* (teleostei: Cichlidae), a new species from the middle paraná basin in misiones, argentina. *Neotropical Ichthyology*, 8(3), pp.643–648.
- Chakrabarty, P., 2004. Cichlid biogeography: Comment and review. *Fish and Fisheries*, 5(2), pp.97–119.
- Chao, N.L., 1995. Ornamental fish resources of Amazonia and aquatic conservation. *OFI Journal, part 1. Species diversity*, 12, pp.241–260.
- Cioffi, M. de B. & Bertollo, L.A.C., 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Repetitive DNA*, 7, pp.197–221.
- Feldberg, E. et al., 2004. B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenetic and Genome Research*, 106(2–4), pp.195–198.
- Feldberg, E., Porto, J. & Bertollo, L., 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. *Fish adaptations*, pp.285–308. Available at: <http://geneticaanimal.inpa.gov.br/publicacoes/capitulos/chromosomalchangesand.pdf>.
- Feschotte, C. and Pritham, E.J., 2007. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes Cédric. *Annu Rev Genet.*, 41, pp.331–368.
- Hernán López-Fernández, Kirk O. Winemiller, R.L.H., 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, pp.1070–1086.
- Howell, W.M. & Black, D.A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*, 63, pp.1014–1015.
- Kullander, Sven O.; Nijssen, H., 1989. The cichlids of Surinam(Teleostei:Labroidi).
- Kullander, S.O., 1998. Cichlid fishes. Behaviour, ecology and evolution. In L. C. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, ed. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre - RS, pp. 461–498.
- Kullander, S.O., 1982. Cichlid fishes from the La Plata basin. Part 2. *Apistogramma commbrae* (Regan, 1906) (Teleostei: Cichlidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 89(1), pp.33–48.

- Kullander, S.O., 2003. Family Cichlidae. In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. pp. 605–654.
- Kullander, S.O. & De Lucena, C.A.S., 2013. *Crenicichla gillmorlisi*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from the Paraná river drainage in Paraguay. *Zootaxa*, 3641(2), pp.149–164.
- Lampe, D. J.; Witherspoon, D.J.; Soto-Adames, F.N., 2003. Recent horizontal transfer of mellifera subfamily mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 20, pp.554–562.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sabdberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, pp.201–220.
- Lomiento, M. et al., 2008. Evolutionary-new centromeres preferentially emerge within gene deserts. *Genome biology*, 9(12), p.R173.
- López-Fernández, H., Honeycutt, R.L., Stiassny, M.L.J., Winemiller, K.O., 2005. Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes: Cichlidae). *zoologica scripta*, 34, pp.627–651.
- López-Fernández, H., Honeycutt, R.L., Winemiller, K.O., 2005. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *molecular phylogenetics and evolution*, 34, pp.227–244.
- Lowe-McConnell, R.H., 1991. Ecology of cichlids in South American and African waters excluding the African Great Lakes. In M. H. A. Keenleyside, ed. *Cichlid fishes: behavior, ecology and evolution*. London, pp. 61–85.
- Margarido, V.P. & Galetti P.M., J., 2000. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3), pp.569–573.
- Martins, I.C.; Portella-Castro, A.J.J.H., 1995. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia*, 60, pp.223–231.
- Martins, C. et al., 2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: Repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetic and Genome Research*, 98(1), pp.78–85.
- Mizoguchi, S.M.H.K., Portella-Castro, A.L.B. & Martins-Santos, I.C., 2007. Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguaçu River. *Genetics and Molecular Research*, 6(3), pp.650–656.
- Monteiro, M., 2011. *Crenicichla regani*. Available at: <http://www.ciclideos.com/crenicichla-regani-f232.html> [Accessed January 5, 2017].
- Montgomery, E.A. et al., 1991. Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: Genome structure and evolution. *Genetics*, 129(4), pp.1085–1098.
- Nakajima, R.T. et al., 2012. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, 12, p.198.
- Noronha, R.C.R. et al., 2016. New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles

- Podocnemis expansa and Podocnemis unifilis (Testudines, Podocnemidae). *Molecular Cytogenetics*, 9(1), p.73. Available at:
<http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-016-0281-5>.
- Ocalewicz, K., 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2–3), pp.114–125.
- Oyhenart-Perera, M.F., L.J.A., B.-Z.N., 1975. Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) y *Crenicichla sexatilis* (Linn.) (Teleostei, Cichlidae). *Rev. Biol. del Uruguay*, 3, pp.29–36.
- Perazzo, G. et al., 2011. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(3), pp.509–515.
- Piálek, L. et al., 2010. *Crenicichla hu*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from the Paraná basin in Misiones, Argentina. *Zootaxa*, (2537), pp.33–46.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), pp.2934–8. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pinsker, W. et al., 2001. The evolutionary life history of P transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. *Chromosoma*, 110(3), pp.148–158.
- Pires, L.B., Sampaio, T.R. & Dias, A.L., 2015. Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *crenicichla lepidota*: New report in the family cichlidae. *Journal of Heredity*, 106(3), pp.289–295.
- Ramirez, S.A. & Sinclair, A.N.D.J.H., 1975. Ribosomal Gene Localization and Distribution (Arrangement) within the Nucleolar Organizer Region of ZEA MAYS. *Genetics*, 80(984), pp.505–518.
- Rousselet, J. et al., 2000. Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 267(1455), pp.1819–23. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1690759&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Salvadori, S. et al., 1995. Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, 3(1), pp.54–58.
- Santos, G.M.; Jegu, M.; Merona, B., 1984. *Catálogo de Peixes Comerciais do Baixo Rio Tocantins* Projeto Tu., Manaus.
- Schneider, C.H. et al., 2013. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: The role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2), pp.201–214.
- Smith, W. L.; Chakrabarty, P.; Sparks, J.S., 2008. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*, 24, pp.625–641.
- Souza, G. et al., 2016. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica*, 144(2), pp.157–166.

- Sparks, J.S. & Smith, W.L.W.L., 2004. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics*, 20, pp.501–517.
- Stiassny, M.L.J., 1991. Phylogenetic intrarelationship of the family Cichlidae. *Keenleyside MHA*.
- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*, 74, pp.304–306.
- Teixeira, W.G. et al., 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125(3), pp.224–234.
- Varella, H.R., Kullander, S.O. & Lima, F.C.T., 2012. *Crenicichla chicha*, a new species of pike cichlid (Teleostei: Cichlidae) from the rio Papagaio, upper rio Tapajós basin, Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(2), pp.233–244.
- Vicari, M.R. et al., 2008. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(1), pp.67–72.
- Vieira, F.G. et al., 2016. *Catalogo de peixes da ESEC Cniã*, Porto Velho - RO.
- Volff, J.N.; Körting, C.; Schartl, M., 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 11, pp.1673–1684.
- Voltolin, T.A. et al., 2013. Chromosomal location of retrotransposable REX 1 in the genomes in five *Prochilodus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) species. *Mobile Genetic Elements*, 3(4), pp.8–11.