

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

CITOGENÉTICA DE *Crenicichla* HECKEL 1840 (PERCIFORMES, CICHLIDAE)

BELÉM
2018

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

CITOGENÉTICA DE *Crenicichla* HECKEL 1840 (PERCIFORMES, CICHLIDAE)

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Aluno: Luan Felipe da Silva Frade

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

BELÉM
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

F799c Frade, Luan Felipe da Silva
Citogenética de *Crenicichla* HECKEL 1840 (Perciformes,
Cichlidae) / Luan Felipe da Silva Frade. — 2019.
43 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha
Coorientador(a): Prof. Me. Bruno Rafael Ribeiro de Almeida
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ecologia Aquática e Pesca, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Peixes neotropicais. 2. Hibridização in situ Fluorescente.
3. Variação cariotípica. 4. Cariótipo ancestral. 5. DNA
repetitivo. I. Título.

CDD 576

LUAN FELIPE DA SILVA FRADE

CITOGENÉTICA DE *Crenicichla* HECKEL 1840 (PERCIFORMES, CICHLIDAE)

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

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

Banca examinadora:

Dra. Renata Noronha (PPGEAP/UFPA, Presidente)

Dr. Leonardo dos Santos Sena (PPGEAP/UFPA, membro interno)

Dr. Cesar Martins (UNESP/Botucatu - membro externo)

Dra. Michelle Orane Schemberger (membro externo - UFPR)

Suplentes:

Jonathan Ready (membro interno, PPGEAP - UFPA)

Cleusa Nagamachi (membro externo - UFPA)

BELÉM
2018

RESUMO

Crenicichla é o maior gênero entre os ciclídeos neotropicais, com ampla distribuição geográfica na América do Sul. É constituído de 87 espécies válidas com taxonomia de difícil descrição, devido à semelhança morfológica entre as mesmas. Citogeneticamente, este gênero apresenta conservação do número diploide $2n = 48$, com alta frequência de inversões pericêntricas, que podem estar relacionadas à ação de DNAs repetitivos. Visando encontrar marcadores citotaxonômicos e investigar o papel de DNAs repetitivos na evolução cromossômica deste gênero, caracterizamos citogeneticamente as espécies *Crenicichla johanna*, *Crenicichla saxatilis*, *Crenicichla regani* e *Crenicichla* sp. “Xingu I” coletadas no Estado do Pará, Brasil. As espécies analisadas apresentaram $2n=48$, mas diferem quanto à fórmula cariotípica e padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva. Um par de cromossomos portador de sítios rDNA 18S foi observado na maioria das espécies, com exceção de *C. johanna*, em que foi registrada extensa variação interpopulacional na quantidade de *clusters* deste rDNA, e sua intercalação com sequências teloméricas intersticiais (ITS). Em todas as espécies a AgNOR é simples e o rDNA 5S é localizado na região intersticial de um par acrocêntrico. Este estudo mostrou que apesar de apresentar $2n$ altamente conservado, as espécies do gênero *Crenicichla* possuem muitas diferenças microestruturais, resultantes de inversões pericêntricas, que corroboraram o diagnóstico taxonômico. O cariótipo de *Crenicichla* Xingu I descrito no presente estudo é singular para o gênero por ser constituído apenas de cromossomos acrocêntricos, similar à proposta de cariótipo ancestral de Cichlidae. A origem da associação rDNA 18S-Tel observada em *C. johanna* é discutida no presente artigo; sugerimos que esta associação possa constituir hot spot de recombinação, favorecendo sua dispersão para outros cromossomos, bem como, rearranjos intracromossômicos nesta espécie.

Palavras-chave:

Peixes neotropicais, FISH, Variação cariotípica, Cariótipo ancestral, DNA repetitivo

Dedico a minha amada família e aos meus amigos, que se propuseram a vivenciar comigo todas felicidades e adversidades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a toda a minha família, em especial a minha esposa Pamella, ao meu pai Djalma, as minhas mães, Marceli e Alessandra que, juntamente com meus irmãos, estiveram comigo durante os momentos mais importantes e significativos da minha vida, me incentivando, me guiando e cuidando, fossem esses momentos, de felicidade ou de adversidade.

A minha orientadora, Renata Noronha, por sempre me incentivar a dar o melhor de mim, pelas contribuições, pela compreensão e amizade.

Ao meu co-orientador, Bruno Almeida, pela grande competência e auxílio no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

Aos professores Cleusa Nagamachi e Julio Pieczarka, pela parceria, por suas contribuições e toda infraestrutura oferecida.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho, que estiveram sempre prontos a me auxiliar e contribuir, não apenas no trabalho, mas na vida.

Ao corpo docente da Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca pela grande competência e dedicação durante minha formação.

Aos órgãos de fomento, CNPQ e CAPES por concederem verba para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Chico Mendes pelas autorizações concedidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Por último e mais importante, agradeço a Deus, pela minha vida, e pelo privilégio de continuar a viver em felicidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Considerações sobre a família Cichlidae	1
1.2- Considerações sobre <i>Crenicichla</i>	1
1.3- Citogenética de Cichlidae com enfoque em <i>Crenicichla</i>	3
2- OBJETIVOS.....	4
2.1- Objetivos gerais	4
2.2- Objetivos específicos.....	5
3- MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1- Citogenética.....	5
3.1.1- Amostragem	5
3.1.2- Obtenção de cromossomos metafásicos	6
3.1.3- Classificação morfológica dos cromossomos	7
3.1.4- Técnica de bandeamento C	7
3.1.5- Técnica de coloração por AgNOR.....	7
4- RESULTADOS PRELIMINARES	10
CAPÍTULO 1	11
5- CONCLUSÃO.....	28
6- REFERÊNCIAS.....	28

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações sobre a família Cichlidae

Cichlidae é um dos grupos de peixes de água doce mais diversificado do mundo, com 1.300 espécies (KULLANDER, 2003), sendo considerada a quarta mais rica família pertencente ao subfilo dos vertebrados (KULLANDER, 1998). Essa grande riqueza de espécies é resultado de uma rápida radiação adaptativa característica deste grupo (GANTE & SALZBURGER, 2012). Sua distribuição geográfica abrange o continente africano, o Oriente médio, 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).

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

Os representantes desta família podem ser encontrados em uma grande diversidade de habitats, desde igarapés, lagos e margens de rios até florestas alagadas e locais rochosos, se estabelecendo principalmente em ambientes lênticos, mas com algumas espécies adaptadas a ambientes lóticos (LOWE-MCCONNELL, 1991; KULLANDER, 2003). A alimentação desses animais é constituída, principalmente, de pequenos invertebrados e de vegetais, mas alguns grupos se alimentam de outros peixes e de plâncton (Kullander, 2003). Esses animais apresentam estratégias reprodutivas complexas modeladas principalmente por pressões bióticas como predação, tornando-os territorialistas e com grande cuidado parental (LOWE-MCCONNELL, 1969). Devido a rápida radiação adaptativa, os ciclídeos são considerados modelos para estudos evolutivos (GENNER et al., 2007; FERREIRA et al., 2010).

Cichlidae é monofilética e subdividida em 4 subfamílias: Etroplinae (Índia e Madagascar), Ptychochrominae (Madagascar), Cichlinae (região neotropical) e Pseudocrenilabrinae (África). Os ciclídeos africanos são considerados grupo irmão dos neotropicais (SPARKS, 2004). Os ciclídeos neotropicais, representados pela subfamília Cichlinae são, segundo dados moleculares, subdivididos em 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.

1.2- Considerações sobre *Crenicichla*

O gênero *Crenicichla*, pertencente à subfamília Cichlinae e à tribo Geophagini, é considerado o maior entre os ciclídeos neotropicais com 87 espécies válidas (CASCIOTTA et al., 2010; CASCIOTTA et al., 2006; LUCENA, 2007; KULLANDER, 2003; KULLANDER et al., 2010; KULLANDER & LUCENA, 2013; MATTOS et al., 2014; MONTANÃ et al., 2008; PIÁLEK, 2010; VARELLA et al., 2012). 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). Devido 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 indivíduos juvenis (SANTOS et al., 1984; BOUJARD, 1997; KULLANDER, 2003).

Neste estudo abordaremos pesquisas sobre as espécies *Crenicichla saxatilis*, *Crenicichla johanna*, *Crenicichla regani* e uma quarta espécie da Amazônia, ainda não descrita na literatura, porém referida como *Crenicichla* sp. “Xingu I”.

- *Crenicichla saxatilis* Linnaeus, 1758: Muitas vezes encontrada em riachos, mas às vezes capturada 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 & NIJSSEM, 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 adulta e é uma das espécies de *Crenicichla* com maior porte e representatividade na pesca comercial do baixo rio Tocantins (SANTOS et al., 1984; VIEIRA et al., 2016).

- *Crenicichla regani* PLOEG, 1989: Possui 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. (KULLANDER, 2003; MONTEIRO, 2011; VIEIRA et al., 2016).
- *Crenicichla* sp. “Xingu I”: Esta 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. (AVILA, 2017).

1.3- 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. Esses rearranjos explicam a variação de $2n=32$ (*Neolamprologus savoryi*) a $2n=60$ (espécies do gênero *Symphysodon*) 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). O número fundamental (NF) varia entre NF=52 em *C. 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.

Apesar da grande conservação do $2n$, alguns estudos relatam a presença de cromossomos B em espécies de *Crenicichla*, geralmente associada a condições ambientais adversas, como observado em *C. reticulata* (FELDBERG et al., 2004) e *C. lepidota* (PIRES et al., 2015).

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).

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. A movimentação de elementos transponíveis, por exemplo, pode promover mudanças estruturais que levariam a eventos como: rearranjos 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. Mapeamento de sequências de DNAs repetitivos pode contribuir como importante marcador citotaxonômico, além de auxiliar no estudo evolutivo do cariótipo desses animais.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

- Investigar o processo de evolução cromossômica em espécies de *Crenicichla*.

2.2- Objetivos específicos

- Caracterizar citogeneticamente as espécies *Crenicichla johanna*, *Crenicichla saxatilis*, *Crenicichla regani* e *Crenicichla* sp. “Xingu I”, buscando fornecer marcadores citotaxonômicos para o grupo.
- Inferir a ocorrência de rearranjos cromossômicos a partir da distribuição de heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo.
- Analisar a organização genômica de DNAs repetitivos em *Crenicichla*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Citogenética

3.1.1- Amostragem

As amostras utilizadas no presente estudo serão compostas de: 13 espécimes de *C. johanna* (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 *C. saxatilis* provenientes do município de Bragança, Pará, Brasil; 1 macho de *C. regani* proveniente do município de Santa Maria do Pará, Pará, Brasil; 8 machos e 1 juvenil de *Crenicichla* sp. Xingu I (Figura 1). A identificação taxonômica das espécies será determinada segundo Vieira et al. (2016), Kullander e Nijssen et al. (1989) e a partir de classificação comercial para *Crenicichla* sp. “Xingu I”. Os espécimes serão tombados na coleção do Laboratório de Citogenética - UFPA, no Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade.

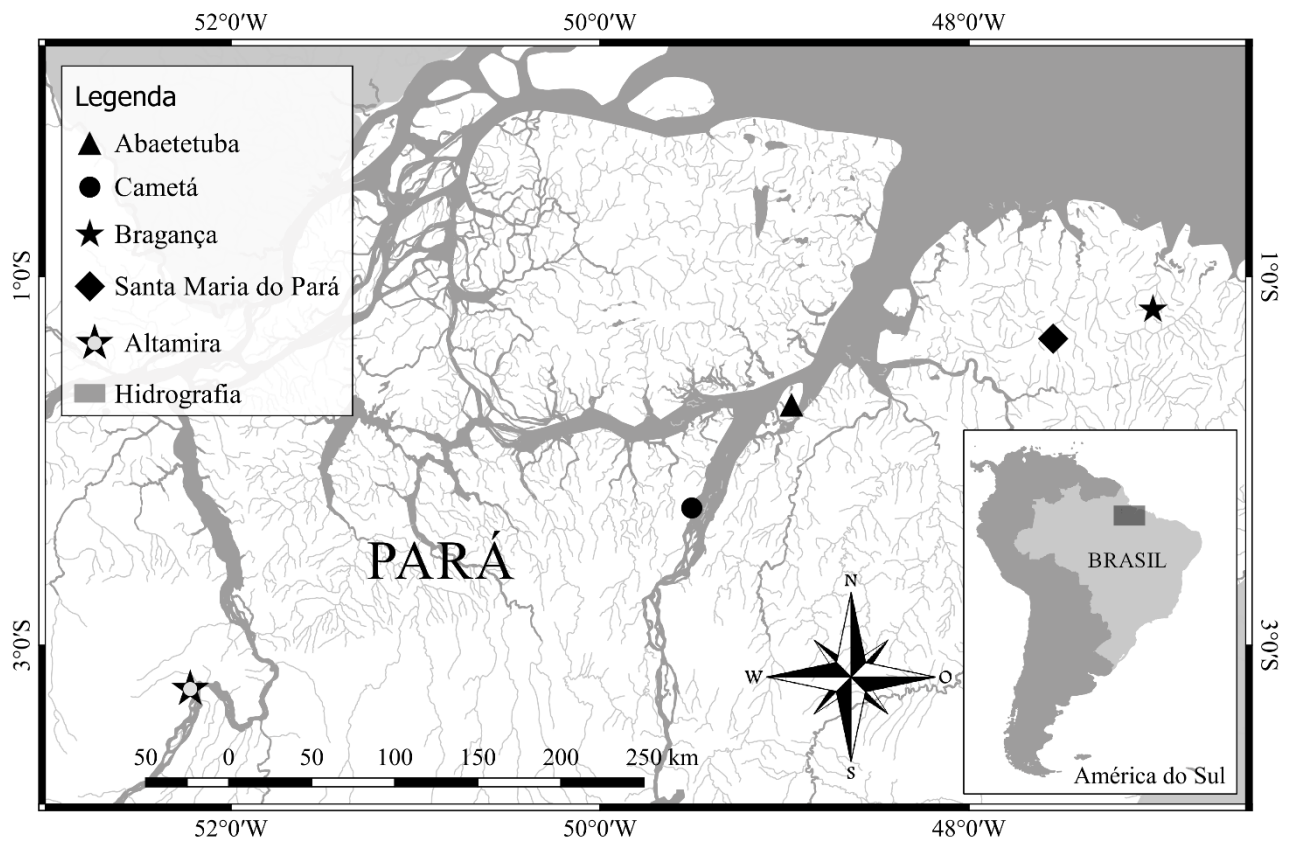


Figura 1: Mapa com a identificação dos pontos de coleta.

3.1.2- Obtenção de cromossomos metafásicos

Os cromossomos mitóticos serão obtidos a partir de células do rim cefálico e caudal dos peixes. A metodologia a ser utilizada foi proposta por Bertollo et al. (1978), com algumas modificações como segue: Injetar solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/ 100g de peso do animal, na região dorso-lateral do animal com o auxílio de uma seringa de insulina; posteriormente manter o animal em aquário aerado por 30 minutos e em seguida eutanásia-lo para a retirada do rim cefálico. O rim extraído será colocado em solução hipotônica de KCl 0,075 M e, com o auxílio de pinça e tesoura, cortado em pedaços menores e dissociado com um macerador de vidro. Em seguida, o material deve ser levado a estufa a 37°C por 30 minutos.

Ao sair da estufa, partes dos tecidos que não foram completamente dissociados serão retirados com auxílio de pinça. Deve-se acrescentar 1mL de fixador Carnoy (3 partes de Metanol e 1 parte de Ácido Acético), ressuspender o material em placa de petri e transferi-lo para tubos de centrífuga, com auxílio de pipeta Pasteur. O material transferido para os tubos deverá ser centrifugado a 1000 rpm, durante 10 minutos e o sobrenadante descartado, novamente deve-se adicionar fixador Carnoy (5-10 mL). O material será ressuspendido e armazenado em freezer - 20 °C.

3.1.3- Classificação morfológica dos cromossomos

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

3.1.4- Técnica de bandeamento C

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

3.1.5- Técnica de coloração por AgNOR

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) serão detectadas por impregnação de Nitrato de Prata, segundo a técnica descrita por Howell & Black (1980) com modificações. Primeiramente, a lâmina será tratada em HCl 0,2 N durante 3 minutos em temperatura ambiente (~27°C), após isso, lavada com água destilada e seca ao ar. Em seguida, será colocada sobre a lâmina uma gota de solução aquosa de gelatina e duas gotas de solução aquosa de Nitrato de

Prata (AgNO₃) cobertas por uma lamínula 24 x 50 mm. A lâmina então, deve ser colocada em câmara húmida em banho maria à 60 °C por 7-9 minutos, com a face virada para baixo, de maneira que a lamínula fique para baixo; posteriormente a lâmina será lavada com jatos de água para remover a lamínula e todo o excesso dos reagentes, e seca ao ar. O processo de coloração será feito com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção 3:1 durante 1 minuto.

3.1.6- Mapeamento cromossômico de DNA repetitivo

3.1.6.1- Isolamento de seqüências repetitivas

O DNA genômico de um indivíduo adulto de *C. johanna* será extraído através do GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sequências utilizadas na produção de sondas para análise de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) serão 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); sequencias teloméricas (TTAGGG e CCCTAA).

3.1.6.2- Nick-translation

As sondas serão marcadas por nick-translation com biotina-14-dATP ou digoxigenina-11-dUTP (Kit Dig-Nick, Roche, EUA). Em um tubo de volume 0,25µL serão adicionados 1µL de DNA (concentração de 1000ng/µL), 4µL de mix de reação e 15µL de água. A reação deve correr a 15°C por 90 minutos. Após isso, a solução será submetida a uma temperatura de 65°C por 10 minutos, e será adicionado 1µL de stop buffer para parar a reação.

3.1.6.3- Hibridização *in situ* fluorescente

Análise de FISH será realizada segundo Pinkel et al. (1986). As lâminas serão 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 à 37°C. Em seguida, as lâminas serão 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 será desnaturada a 70°C. A desnaturação do DNA cromossômico será realizada em formamida 70% a 65°C no intervalo de tempo de 20-40 segundos. Após a

desnaturação, a solução de hibridização será colocada sobre a região das metáfases na lâmina e em seguida deve-se colocar uma lamínula de vidro e selar. A hibridização ocorrerá em câmara úmida em estufa a 37°C durante 24h. As sondas serão detectadas com avidina-CY3 ou antidigoxigenina-FITC. Os cromossomos serão contracorados com DAPI, contendo antifading Vectashield.

3.1.6.4- Fiber-FISH

O fiber-FISH será realizado segundo Barros et al. (2011). As lâminas usadas para o fiber-FISH serão 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 serão desidratadas em bateria de álcool como segue: 5 minutos em álcool 70%, 5 minutos em álcool 85% e 5 minutos em álcool 100%. Sobre a base da lâmina deve se colocar 300µL de solução de NaOH 0.15M (300µL de NaOH 0.5M diluído em 700µL de álcool 30%) e com o auxílio de uma segunda lâmina deve-se fazer o esfregaço sobre o material citológico, de maneira que as fibras nos núcleos interfásicos sejam arrastadas e esticadas mecanicamente. Após isso, as lâminas serão postas em posição inclinada e sobre elas colocar 500µL de álcool 100%. Após isso deve-se realizar a FISH.

3.1.6.5- Análise de imagens

As lâminas contendo as preparações cromossômicas utilizadas para as técnicas de citogenética clássica, serão analisadas em microscópio Olympus BX41 e fotografadas com câmera digital Cânon Powershot A95. Os cariótipos serão montados com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS5. As imagens de FISH serão capturadas por uma câmera CCD AxioCam MRm (Nikon) acopladas ao microscópio de Epifluorescência Nikon H550S (Nikon). A captura das imagens será intermediada pelo programa Nis-Elements (Nikon). A edição das imagens (ajuste de brilho e contraste, montagem do cariótipo etc.) será feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.

4- RESULTADOS PRELIMINARES

Os resultados do presente projeto serão apresentados em um capítulo referente ao seguinte artigo:

Artigo: CARIOEVOLUÇÃO EM *Crenicichla* (HECKEL 1840): UM PROCESSO MEDIADO POR INVERSÕES

CAPÍTULO 1

KARYOEVOLUTION OF *Crenicichla* HECKEL 1840 (Cichlidae, Perciformes): A PROCESS MEDIATED BY INVERSIONS

Luan Felipe da Silva Frade¹; Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Susana Suely Rodrigues Milhomem–Paixão²; Jonathan Stuart Ready¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha^{1*}

¹Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Universidade Federal do Pará, Campus Guamá, Rua Augusto Corrêa, nº 01. Guamá, Belém – Pará, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, campus Valparaíso de Goiás, BR-040, km 6, Avenida Saia Velha, S/N, Área 8, Parque Esplanada V. 72.876-601.

*Corresponding author:

Renata Coelho Rodrigues Noronha

E-mail: renatacrn@gmail.com

Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá, Rua Augusto Corrêa, nº 01. Guamá,
66075-900 Belém – Pará, Brasil

ABSTRACT

Crenicichla (Cichliformes, Cichlidae) present a highly conserved diploid number $2n=48$ with fundamental numbers varying between 52 and 62. We analyzed four species in order to investigate the role of repetitive DNA in chromosome evolution in the genus. *C. johanna*, *C. cf. saxatilis* and *C. cf. regani* have $2n=48$ (8m/sm and 40st/a) and FN = 56, while *Crenicichla* sp. "Xingu I" has $2n = 48$ (48 st/a) and FN = 48. Different patterns of constitutive heterochromatin distribution were observed including pericentric, interstitial and whole arm C bands. A single chromosome bears 18S rDNA clusters in most species, except *C. johanna*, where population variation exists in terms of the quantity and distribution of clusters and their association with interstitial telomeric sequences. All species showed hybridization of 5S rDNA sequences in an interstitial region on an acrocentric chromosome pair. The karyotypic differences and maintenance of the diploid number supports chromosome evolution mediated by inversions in *Crenicichla*. The telomeric and 18S rDNA sequence association in various chromosomes of *C. johanna* are proposed to represent hotspots for breakage, favoring intrachromosomal rearrangements. The results suggest that repetitive sequences can contribute to microstructural cytogenetic diversity in *Crenicichla*.

Key-words: Neotropical fish, FISH, karyotypic variation, ancestral karyotype, repetitive DNA

INTRODUCTION

Crenicichla Heckel, 1840 (Cichliformes) is considered the most species rich genus of Neotropical cichlids with approximately 90 valid species, subdivided in nine groups based on morphology (Kullander 2003; Varella and Ito, 2017). The genus is widely distributed in all river basins east of the Andes including coastal drainages from Venezuela and the Guianas as far South as the Plata river in Argentina (Kullander 2003; Kullander et al. 2010; Casciotta et al. 2010; Mattos et al. 2014).

Currently, only 24 species of *Crenicichla* have been analyzed by classical cytogenetic methods. All species have presented a diploid number of $2n = 48$, an absence of heteromorphic sex chromosomes and an active AgNOR on a single chromosome pair (Benzaquem et al. 2008). Despite the conserved diploid number, members of this genus have shown high interspecific variation in the fundamental number (FN), from FN=52 in *C. cf. saxatilis* to FN=62 in *C. niederleinii* (Arai, 2010), suggesting the occurrence of intrachromosomal rearrangements, including many pericentric inversions (Feldberg et al. 2003) (Table 1).

Repetitive DNA constitutes a large part of the genome of eukaryotes, and may be arranged in tandem (satellite DNA, histone genes, etc.) or be dispersed along chromosomes (transposable elements) (Charlesworth et al. 1994). Repetitive sequences may be directly related to karyotypic diversification mechanisms in taxa with stable diploid numbers such as in *Crenicichla*. The presence of repetitive DNA clusters in some genomic regions may represent fragile breakage sites that are repeatedly associated with rearrangements during chromosome evolution (Feschotte and Pritham 2007; Schneider et al. 2010). In the fish family Loricariidae, the association of 5S rDNA and interstitial telomeric sequences (ITs) has been proposed to produce hot spots for genomic repatterning (Barros et al. 2017). In *Crenicichla* chromosomal mapping using repetitive DNA has only been performed in *Crenicichla lepidota* (18S and 5S rDNA), making it impossible to infer the role of these sequences in the karyoevolution of the genus (Perazzo et al. 2011).

The present study reports cytogenetic data for four Amazonian species of *Crenicichla*, used to analyze the genomic organization of repetitive DNA sequences and investigate their contribution to chromosome evolution in the genus.

Table 1: Cytogenetic data for *Crenicichla* species

<i>Crenicichla iguassuensis</i>	48	2M + 6SM + 14ST + 26A	Brazil (PR)	Mizoguchi et al. (2007)
<i>Crenicichla iguassuensis</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (PR)	Benzaquem et al. (2008)
<i>Crenicichla inpa</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (Bacia amazônica)	Benzaquem et al. (2008)
<i>Crenicichla johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Bragança, PA, Brazil	Present work
<i>Crenicichla johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Cametá, PA, Brazil	Present work
<i>Crenicichla</i> cf. <i>johanna</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Brazil (Amazon Basin)	Benzaquem et al. (2008)
<i>Crenicichla lacustris</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (SP)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
<i>Crenicichla lepidota</i>	48	6M/SM + 8ST + 34A	South America	Thompson (1979)
<i>Crenicichla lepidota</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (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	Brazil (PR)	Martins et al. (1995)
<i>Crenicichla lucius</i>	48		Amazonas river	Thompson (1979)
<i>Crenicichla lugubris</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Brazil (Amazon Basin)	Benzaquem et al. (2008)
<i>Crenicichla niederleinii</i>	48	2M + 12SM + 4ST + 30A	Brazil (PR)	Martins et al. (1995)
<i>Crenicichla niederleinii</i>	48	2M + 8SM + 38 ST/A	Brazil (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	Amazonas river	Thompson (1979)
<i>Crenicichla</i> cf. <i>regani</i>	48	8M/SM + 40ST/A	Santa Maria, PA, Brazil	Present work
<i>Crenicichla reticulata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (Amazonas river)	Benzaquem et al. (2008), Feldberg et al. (2004)
<i>Crenicichla saxatilis</i>	48	4M + 44A	South America	Oyhenart-Perera et al. (1975), Hinegardner & Rosen (1972)
<i>Crenicichla</i> cf. <i>saxatilis</i>	48	4M + 44A	Bragança, PA, Brazil	Present work
<i>Crenicichla semifasciata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Argentina	Fenocchio et al. (2003)
<i>Crenicichla semifasciata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (MS)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
<i>Crenicichla strigata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Amazonas river	Thompson (1979)
<i>Crenicichla vittata</i>	48	6M/SM + 42ST/A	Brazil (MS)	Feldberg & Bertollo (1985); Feldberg & Bertollo (1985)
<i>Crenicichla</i> sp.	48	2M + 6SM + 40ST/A	Brazil (SC)	Lorerio et al. (2000)
<i>Crenicichla</i> sp. "Xingu I"	48	48ST/A	Altamira, PA, Brazil	Present work

MATERIAL AND METHODS

Data describing the samples used in this study and their origin are described in Table 2 and the collection localities indicated in Figure 1.

Table 2: Number of individuals, divided by sex and maturity, and collection locality information for *Crenicichla* samples analyzed in the present study.

Species	Population	Number of specimens	Sex	Geographical coordinates
<i>C. johanna</i>	Abaetetuba	7	2M 2F 3J	1°40'46.6"S 48°56'12.9"W
<i>C. johanna</i>	Cametá	6	2M 1F 3J	2°15'35.5"S 49°30'13.5"W
<i>C. cf. saxatilis</i>	Bragança	6	3M 2F 1J	1°10'47.0"S 47°00'11.5"W
<i>C. cf. regani</i>	Santa Maria do Pará	1	1M	1°20'15.6"S 47°32'39.1"W
<i>C. sp. "Xingu I"</i>	Altamira	9	8M 1J	3°13'41.2"S 52°12'50.5"W

Note: Male (M), Female (F) and Juvenile (J); South (S), West (W)

All samples were deposited in the collection of the Laboratório de Citogenética, Federal University of Pará, Brazil. The taxonomic identification of samples was based on Kullander and Nijssen (1989), Kullander (2003), Ito and Py-Daniel (2015) and Varella and Ito (2017) or, in the case of *Crenicichla* sp. "Xingu I", using the commercial trade name for the species which has not yet been formally described (Avila, 2008). When species match original descriptions but come from a single location within a generally wide species distribution, and where new species have been described for populations from some part of the distribution of that original widespread species, we use the conservative identification "cf." before the specific epithet. Samples were collected under license (SISBIO 13248) and all work performed in accordance with ethical approval by the Federal University of Pará Committee for the Ethical Use of Animals (CEUA 68-2015).

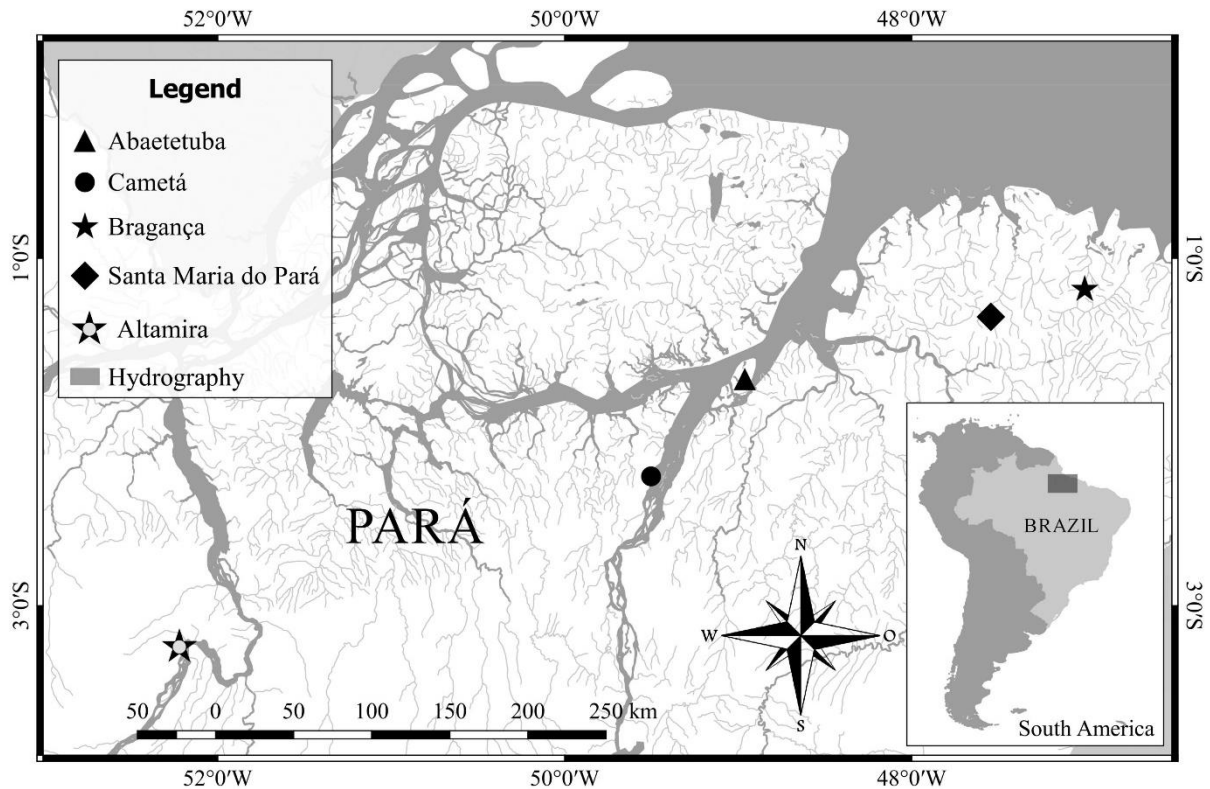


Figure 1: Map indicating sample collection locations of *Crencichla* analyzed cytogenetically in this study.

Chromosome preparations were obtained following Bertollo et al. (2015) and classified following Levan et al. (1964). The distribution of constitutive heterochromatin (CH) and Nucleolar Organizing Regions (NORs) were determined following Sumner (1972) and Howell & Black (1980), respectively.

Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) probes for 18S and 5S rDNA were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using genomic DNA from *C. johanna*, and the following primer pairs: 18S rDNA (18SF-5' CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT and 18SR-5' CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA); 5S rDNA (5SF-5' GCC ACA CCA CCC CTG AAC AC and 5SR-5' GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC). Telomeric sequences were amplified by PCR using complementary primers (TTAGGG)_n and (CCCTAA)_n, without the use of template DNA, following Ijdo et al (1991).

FISH was performed following Pinkel et al. (1986). The hybridization solution comprised of 2μL of probe, formamide (50%), 2SSC and dextran sulphate, denatured at 70°C. Denaturation of chromosomal DNA was performed in 70% formamide at 65°C. Hybridization occurred at 37°C, overnight. Probes were detected using avidin-CY3 or antidigoxigenin-FITC. Chromosomes were counterstained with DAPI containing antifading Vectashield.

Fiber-FISH was performed following Barros et al (2011). Cytologically prepared slides were washed in 1x PBS for five minutes. Chromatin fibers were extended by brushing with 0.15 M NaOH diluted in 30% ethanol. Subsequently, 500 μ L of ethanol was added directly to the slides, and the material dehydrated using a battery of ethanol prior to analyses by FISH.

Slides were analyzed on an Olympus BX41 microscope and photographed using a Canon Powershot A95 camera. FISH images were captured using a CCD AxioCam MRm (Nikon) camera coupled to an Epifluorescence Nikon H550S (Nikon) microscope and using the program Nis-Elements (Nikon). Image editing to adjust brightness, contrast and mount karyotypes was performed in Adobe Photoshop CS5.

RESULTS

All analyzed *Crenicichla* species have $2n=48$ and heteromorphic sex chromosomes are absent (Fig 2). The species *C. johanna*, *C. cf. saxatilis* and *C. cf. regani* present $FN=56$ and a karyotypic formula of $8M/SM$ and $40ST/A$ (Fig 2A,C,E,G). In contrast, *Crenicichla* sp. Xingu I presented $FN=48$ and a karyotypic formula of $48ST/A$ (Fig 2I, J).

In all four species C banding revealed CH in the pericentromeric region of the majority of chromosomes (Fig 2B,D,F,H,J). In *C. johanna* some chromosomes presented additional CH in the terminal region (Fig 2B,D); samples of this species from the population from Cameté (CA) also presented a completely heterochromatic short arm on chromosome pair 2, with size heteromorphism between homologs (Fig 2D). These characteristics were not found in the population from Abaetetuba (AB) where the heterochromatic block is localized pericentrically and extends only halfway along the long arm (Fig 2B). In *C. cf. saxatilis* additional C bands were observed at a secondary constriction in chromosome pair 1 (Fig 2F). In *C. cf. regani* additional C bands were observed on pairs 3, 7 and 22 (Fig 2H). In *C. sp. "Xingu I"* interstitial C bands were present on chromosome pairs 1, 3, 7, 8, 10, 20, 21 and 22 (Fig 2J).

Staining with AgNOR showed that in all species only one chromosome pair showed active rDNA sites. In *C. johanna* the active AgNOR bearing pair is 5 for the population AB (Fig 2B) and 2 for the population CA (Fig 2D), coinciding with the CH block on the short arm, demonstrating geographic variation for this marker.

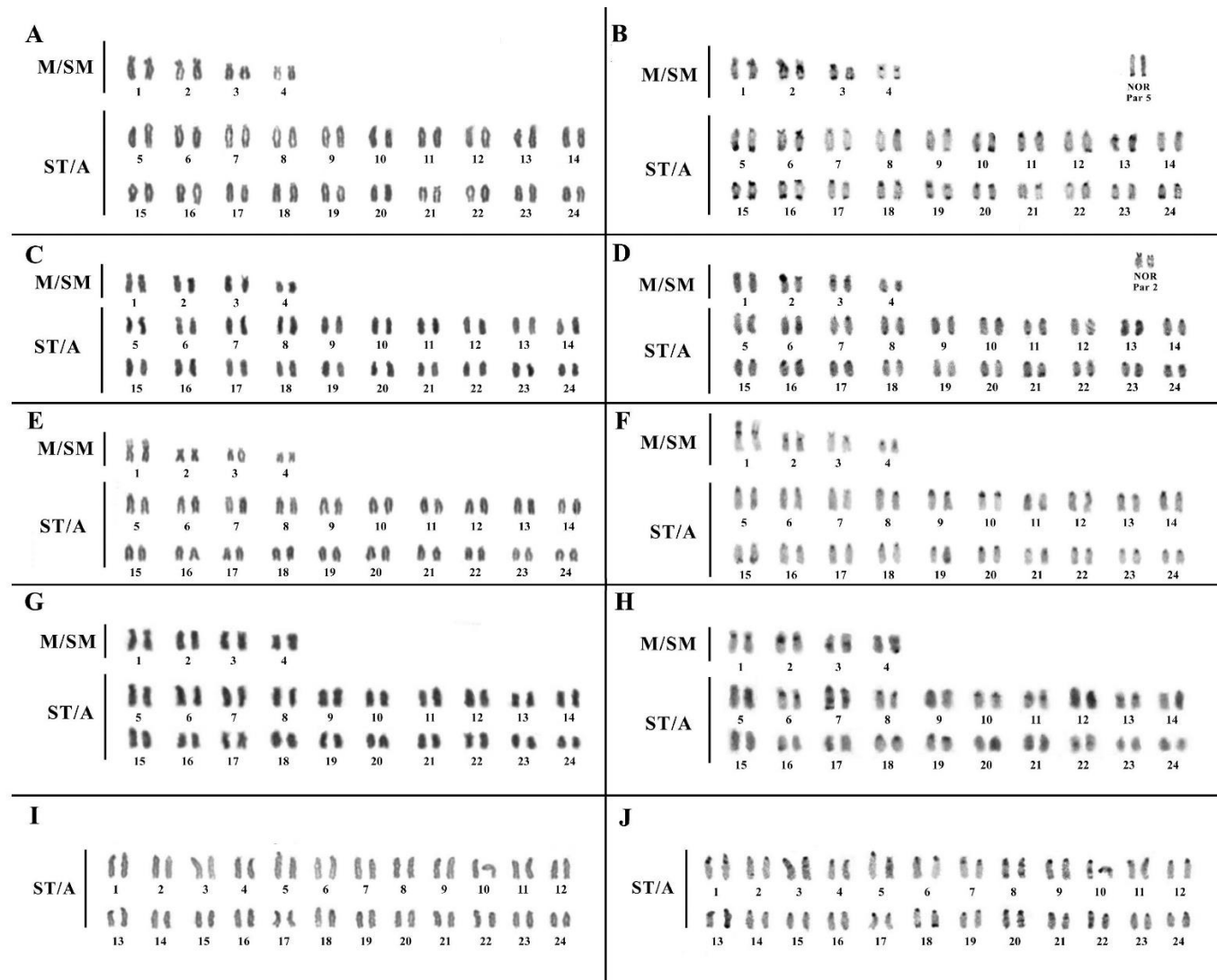


Figure 2: Karyotypes of *Crenicichla* species based on Giemsa staining (A, C, E, G, I) and C banding (B, D, F, H, J): (A-B) *C. johanna* AB; (C-D) *C. johanna* CA; (E-F) *C. cf. saxatilis*; (G-H) *C. cf. regani*; (I-J) *C. sp.* "Xingu I".

Chromosome mapping using 18S rDNA probes, showed multiple hybridization locations that were variable between the two sampled populations of *C. johanna*. Individuals from the AB population showed clusters on only one of the homologs of chromosome pairs 1, 6, 17 and 22 and on both homologs of chromosome pair 5 (Fig 3A). In comparison, individuals from the CA population only showed clusters on the short arm of chromosome pair 2 and the terminal region of one of the homologs of chromosome pair 16 (Fig 3B). In *C. cf. saxatilis* 18S rDNA probes hybridized around a secondary constriction in the short arm of chromosome pair 1 (Fig 3C). In *C. cf. regani* 18S rDNA probe hybridization was observed along the short arm of chromosome pair 2 (Fig 3D). In *Crenicichla* sp. “Xingu I” hybridization occurred in the terminal region of one acrocentric chromosome pair (Fig 3E). In this case, it was impossible to determine which chromosome pair because of the great similarity in size and acrocentric morphology of so many chromosome pairs in the karyotype.

In all four species, FISH with telomeric probes (TTAGGG) showed hybridization locations in the distal regions of all chromosomes (Fig 3). In *C. johanna* variable numbers of hybridization location clusters were observed that were syntenic with 18S rDNA locations. There were 6 such clusters in individuals from the AB population and 3 clusters in individuals from the CA population (Fig 3A,B). In both cases Fiber-FISH analysis revealed that telomeric and 18S rDNA sequences are associated and arranged in an intercalated manner (Fig 3A). Interstitial telomeric sequences (ITS) were found in *C. cf. saxatilis*, located in the pericentromeric region of chromosome pair 1 (Fig 3C).

In all species the 5S rDNA probes hybridized in an interstitial region of one of the acrocentric chromosome pairs (Fig 3F).

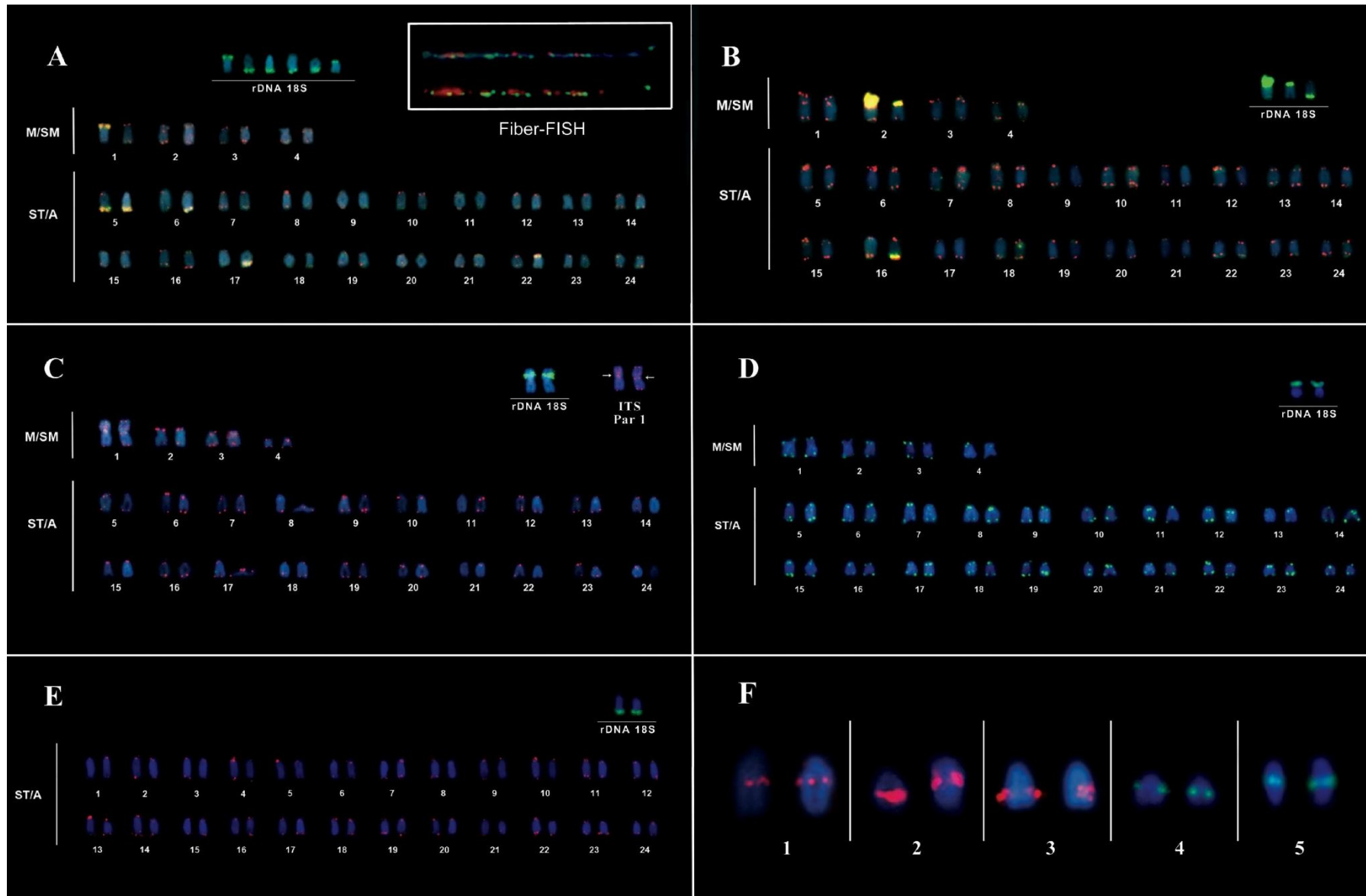


Figure 3: FISH and Fiber-FISH showing telomeric (red) and 18S rDNA (green) probe hybridization locations in *Crenicichla* species: **(A)** *C. johanna* AB, inset: Fiber-FISH and chromosomes bearing 18S rDNA; **(B)** *C. johanna* CA, inset: chromosomes bearing 18S rDNA; **(C)** *C. cf. saxatilis*, inset: chromosome pair 1 bearing 18S rDNA and pericentromeric ITS; **(D)** *C. cf. regani*, inset: chromosome pair bearing 18S rDNA; **(E)** *C. sp.* "Xingu I", inset: chromosome pair bearing 18S rDNA. Yellow regions in A and B represent sites with syntenic localization of 18S rDNA and telomeric probes in *C. johanna*. FISH showing 5S rDNA probe hybridization locations in *Crenicichla* species: **(F1)** *C. johanna* AB; **(F2)** *C. johanna* CA; **(F3)** *C. cf. saxatilis*; **(F4)** *C. cf. regani*; **(F5)** *C. sp.* "Xingu I".

DISCUSSION

Karyoevolution in *Crenicichla*

The conserved diploid number of 48 chromosomes in the four species of *Crenicichla* analyzed here is common to 75% of species in the subfamily Cichlinae (Schneider et al. 2013; Perazzo et al. 2011).

However, the data produced here shows for the first time a completely different karyotype in the species *Crenicichla* sp. “Xingu I” with 48 acrocentric chromosomes (FN=48, see Fig 2i), differing from all other *Crenicichla* species analyzed to date that have some metacentric or submetacentric chromosomes. This pattern ($2n=48$ and FN=48) is similar to the proposed ancestral karyotype of Feldberg et al. (2003) where a comparison of cytogenetic data from many species of Cichlidae and phylogenetic data (Farias et al. 2000) were used to propose the idea that Neotropical cichlids, including *Crenicichla*, show a strong tendency for chromosomal rearrangement as a result of pericentric inversions. Considering that hypothesis, we explain the origin of the *Crenicichla* sp. “Xingu I” karyotype in one of two ways: (1) The species maintained the ancestral conserved karyotype; or (2) The species suffered new inversion events to develop a derived karyotype that is similar to the ancestral form.

The karyotype described here for *C. cf. saxatilis* (8M/SM and 40ST/A) is different to that described for *C. saxatilis* by Oyhenart-Pereira et al. (1975) (6M/SM and 44ST/A), revealing interpopulation or interspecific (in case they represent undescribed cryptic species) variation, with the relative increase of a pair of M/SM chromosomes and an equivalent reduction in the number of acrocentric pairs in the populations studied here. This information, associated with the presence of ITS in the pericentromeric region of chromosome pair 1 (M/SM) (see Fig 3c), suggests that the population studied here shows a recent pericentric inversion in an acrocentric pair to form chromosome pair 1. The pericentric ITS represents the remains from the inversion process as suggested for the snake *Corallus hortulanus* (Viana et al. 2016), and in the rodent genera *Microtus* (Rovatsos et al. 2011) and *Phodopus* (Paço et al. 2012).

The presence of 5S rDNA at the interstitial region of an acrocentric chromosome pair in all four species represents a conserved characteristic in the Cichlidae (Nakajima et al. 2012). However, previous research described variation in the distribution of this marker in *Crenicichla lepidota*, with the presence of 5S rDNA in the interstitial region of two acrocentric chromosome pairs instead of one pair (Perazzo et al. 2011). Studies in various species of fishes have shown that 5S rDNA hybridization can present variation in number, structure and origin of marked locations (Martins et al. 2002; Nakajima et al. 2012; Barros et al. 2017), demonstrating a

difference in microstructural organization of the karyotype in the genus, despite the conserved diploid number.

Association of heterochromatin and repetitive DNA in *C. johanna*

The distribution of CH in pericentromeric and terminal regions of chromosomes is common in species of *Crenicichla* (Mizoguchi et al. 2007; Molina et al. 2014; Pires et al. 2015). The heterochromatinization of parts of the genome can be characterized as a repression of recombinant processes, protecting the genomic integrity of the organism (Grewal and Jia, 2007). As such, the heterochromatinization of the whole short arm of chromosome pair 2 in the CA population of *C. johanna* (Fig 2D) may be the result of the amplification of CH (Margarido and Galetti, 2000) in the region that contains co-localized telomeric sequences (Fig 3B). The CH may help stabilize these sites where the syntenic blocks of 18S rDNA would otherwise result in instability with frequent recombination (Ocalewicz, 2003). The size heteromorphism observed between homologues of this chromosome pair may be associated with simple translocations or unequal crossing-over (Szostak and Wu, 1980).

The variability of the distribution of 18S rDNA between populations of *C. johanna*, marking 6 chromosomes in the AB population and 3 in the CA population (Fig 3A,B), may be explained by: (1) ectopic recombination, resulting from the physical approximation of chromosomes during meiotic interphase or prophase, when the marked chromosomes could present the Rab1 or *bouquet* configurations (respectively), as described for the scorpion *Tityus obscurus* (Almeida et al. 2017); (2) translocations, considering that heterochromatic regions rich in rDNA are also considered hotspots for chromosome breaks (Rousselet et al. 2000); or (3) transposition of active transposable elements (Symonová et al. 2013)

In addition to the great variability in 18S rDNA sites between the two populations of *C. johanna*, the active NOR bearing chromosome pair differs between populations (Fig 2B,D and Fig 3A,B). Furthermore, the results obtained here are distinct from those of Benzaquem et al. (2008) for a population of *C. johanna* from the Catalão river in the state of Amazonas, Brazil, where the active NOR is on the short arm of chromosome pair 24. This difference may be the result of competition between nucleolar chromosomes with varying capacities for synthesis or organization of small and large nucleoli (Ramirez and Sinclair, 1975), demonstrating that the active 18S rDNA site can vary between populations of *C. johanna*. Alternatively silencing of rDNA sites through the action of other repetitive DNA may occur as observed with As51 satellite DNA (Vicari et al. 2008).

The association of telomeric and 18S rDNA visualized by Fibre-FISH demonstrated the occurrence of various ITSs intercalated with NOR sequences, as proposed for *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* (Salvadori et al. 1991). The association of telomeric and rDNA sequences has been observed in plants (Souza et al. 2016) and other fishes (Ashley and Ward, 1993). Although the origin and genomic function of this syntenic association is unknown, some authors suggest that it is a hotspot for chromosomal breaks, increasing the chances of chromosomal rearrangements (Ashley and Ward, 1993; Bolzán, 2011; 2017). It is known that 45S rDNA sequences can generate instability in plants and animals because secondary constrictions that develop during chromosome condensation include fragile sites, promoting chromosome breaks (Huang et al. 2008; Cazaux et al. 2011)

By associating the pattern of ITSs in metacentric pairs described in this study with the karyotype evolution model for Neotropical cichlids of Feldberg et al. (2003), we propose that the association of telomeric and 18S rDNA sequences is strongly related to chromosomal break points that are important for genomic repatterning in *Crenicichla*.

ACKNOWLEDGMENTS

Sample collection was authorized by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). CYN (305880/2017-9) and JCP (305876/2017-1) are grateful to CNPq for Productivity Grants. This study is part of the Master dissertation of LFSF in Aquatic Ecology and Fisheries who is a recipient of a CAPES studentship. BRRR is a recipient of a CNPq Doctoral Scholarship in Genetics and Molecular Biology. We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for funds from the project coordinated by CY Nagamachi (Edital Pró-Amazônia Proc 047/2012); and also thank the Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES (Operação 2.318.697.0001) for funds from a project coordinated by JC Pieczarka.

REFERENCES

- Kullander SO (2003) Family Cichlidae. in Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Reis RO, Kullander SO and Ferraris CJ, (eds), pp. 605–54, Edipucris, Porto Alegre.
- Varella HR, Ito PMM (2017) *Crenicichla dandara*, new species: the black jacundá from the Rio Xingú (Teleostei: Cichlidae). Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 166:1-12. <https://doi.org/10.1635/053.166.0104>
- Kullander SO, Norén M, Friðriksson GB, Santos de Lucena CA (2010) Phylogenetic relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South America based on the mitochondrial cytochrome b gene. J. Zool. Syst. Evol. Res.;48:248–258. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2009.00557.x>
- Casciotta J, Almirón A, Piálek L, Gómez S, Rícan O (2010) *Crenicichla ypo* (Teleostei: Cichlidae), a new species from the middle Paraná basin in misiones, Argentina. Neotrop. Ichthyol.;8:643–648.
- Mattos JL, Schindler I, Ottoni FP, Cheffe MM (2014) A new species of *Crenicichla* from the upper Rio das Antas basin, dos Patos lagoon system, southern Brazil (Teleostei: Cichlidae). Vertebr. Zool.;64:35–42.
- Benzaquem DC, Feldberg E, Porto JIR, Gross MC, Zuanon JAS (2008) Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). Genet. Mol. Biol.;31:250–255. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008000200016>
- Arai R (2010) Fish karyotypes: a check list. Springer, Tokyo, Japan.
- Feldberg E, Porto J, Bertollo L (2003) Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. in Fish Adaptation, Val AL and Kapoor, (eds). Science Publishers Inc, Enfield, NH;285–308.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Wolfgang S (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature. 371:215–220. <http://dx.doi.org/10.1038/371215a0>
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR, Martins C, et al. (2013) Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. Rev. Fish Biol. Fish.;23:201–214. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9285-3>
- Feschotte C, Pritham EJ. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. Annu Rev Genet. 2007;41:331–368. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
- Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA role? Gene.; 608:20-27. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.013>
- Perazzo G, Noleto RB, Vicari MR, Machado PC, Gava A, Cestari MM (2011) Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. Rev. Fish Biol. Fish.;21:509–515. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9170-x>

- Kullander SO, Nijssen H (1989) The cichlids of Surinam (Teleostei:Labroidei). Brill, Amsterdam, Netherlands.
- Ito PMM, Py-Daniel LHR (2015) A small new species of *Crenicichla* Herckel, 1840 from middle rio Xingu, Brazil (Teleostei: Cichlidae). *Neotrop. Ichthyol.* 13: 471-478. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140105>
- Avila MA. *Crenicichla* sp. “Xingu I”. Orange Cichlid Pike - *Crenicichla* sp. “Xingu I.”. Available at http://www.aquahobby.com/gallery/e_creni.php. Accessed August 20, 2018.
- Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. Direct Chromosome Preparation from Freshwater Teleost Fishes. In *Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F and Toledo LFA, (eds), pp. 21–26, CRC Press, Boca Raton, FL, 2015.
- Levan, A. Fredga, K. Sabdberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.*52:201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.*74:304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Howell, W.M. Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia.*63:1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.*;19:4780.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*;83:2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>
- Barros AV, Sczepanski TS, Cabrero J, Camacho JPM, Vicari MR, Artoni RF (2011) Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture*;322–323:47–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.002>
- Farias IP, Ortí G, Meyer A. (2000) Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of Cichlid fishes. *J. Exp. Zool.*; 288:76–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(20000415\)288:1<76::AID-JEZ8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(20000415)288:1<76::AID-JEZ8>3.0.CO;2-P)
- Oyhenart-Perera MF. Luengo JA. Brum-Zorrilla N (1975) Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) y *Crenicichla sexatilis* (Linn.) (Teleostei, Cichlidae). *Rev. Biol. del Uruguay.*;3:29–36.
- Viana PF, Ribeiro LB, Souza GM, Chalkidis HM, Gross MC, Feldberg E (2016) Is the Karyotype of Neotropical Boid Snakes Really Conserved? Cytotaxonomy, Chromosomal Rearrangements and Karyotype Organization in the Boidae Family. *PLoS One.*1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160274>
- Rovatsos MT, Marchal JA, Romero-Fernández I, Fernández FJ, Giagia-Athanosopoulou EB, Sánchez A (2011) Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosom. Res.*19:869–882. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9242-3>

Paço A, Chaves R, Vieira-da-Silva A, Adega F. (2012) The involvement of repetitive sequences in the remodelling of karyotypes: The *Phodopus* genomes (Rodentia, Cricetidae). *Micron*. 46:27-34 <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.11.010>

Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C (2012) Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evol. Biol.*;12:198. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-198>

Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM, et al. (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: Repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet. Genome Res.*;98:78–85. <https://doi.org/10.1159/000068542>

Molina WF, Pacheco GA, Berbel Filho WM (2014) Padrões Citogenéticos de duas Espécies de ciclídeos de Bacias do Semi-Árido do Brasil: *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*. *Biota Amaz.* 4:33–39. <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p33-39>

Mizoguchi SMHK, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC (2007) Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguaçú River. *Genet. Mol. Res.*6:650–656.

Pires LB, Sampaio TR, Dias AL (2015) Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *Crenicichla lepidota*: New report in the family cichlidae. *J. Hered.*106:289–295. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv007>

Grewal SIS, Jia S (2007) Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics.*;8:35–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>

Margarido VP, Galetti PMJ (2000) Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genet. Mol. Biol.*;23:569–573. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000300012>

Ocalewicz K (2013) Telomeres in fishes. *Cytogenet. Genome Res.*;141:114–125. <https://doi.org/10.1159/000354278>

Szostak JW, Wu R (1980) Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*;284:426–430. <https://doi.org/10.1038/284426a0>

Almeida BRR, Milhomem-paixão SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, Costa MJR, Pardal PPO, et al. (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics*1–11. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0494-6>

Rousselet J, Monti L, Auger-Rozenberg MA, Parker JS, Lemeunier F (2000) Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proc. Biol. Sci.*267:1819–1823. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1216>

Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, et al. (2013) Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: An extremely rapid speciation driven by

stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol. Biol.*;13:1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-42>

Ramirez SA, Sinclair ANDJH (1975) Ribosomal Gene Localization and Distribution (Arrangement) within the Nucleolar Organizer Region of *Zea mays*. *Genetics*. 80:505–518.

Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenet. Genome Res.*;122:67–72. <https://doi.org/10.1159/000151318>

Salvadori S, Deiana AM, Elisabetta C, Florida G, Rossi E, Zuffardi O (1995) Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosom. Res.* 3:54–58. <https://doi.org/10.1007/BF00711162>

Souza G, Vanzela ALL, Crosa O, Guerra M (2016) Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica*. 144:157–166. <https://doi.org/10.1007/s10709-016-9886-1>

Ashley T, Ward DC (1993) A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the armenian hamster. *Cytogenet. Cell Genet.*;62:169–171. <https://doi.org/10.1159/000133464>

Bolzán AD (2011) Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*.27:1–15. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger052>

Bolzán AD (2017) Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. *Mutat. Res.*773:51–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.04.002>

Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP, Britton-davidian J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol. Biol.*11:1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-124>

Huang J, Ma L, Yang F, Fei SZ, Li L (2008) 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *Plos One*. 3:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002167>

5- CONCLUSÃO

Concluimos que, apesar de apresentarem grande conservação quanto ao número diplóide, as espécies de *Crenicichla* possuem muitas diferenças microestruturais no genoma. A variação na organização de diversas sequências de DNA repetitivo evidencia a diversidade no patrimônio genético dessas espécies.

Através do mapeamento das sequências de DNA repetitivo observamos sítios de DNA repetitivo que sugerem a ocorrência de rearranjos, como observado na população de *C. saxatilis*, onde o aumento do NF é, provavelmente, resultado do processo de inversões pericêntricas em um par de cromossomos ST/A.

Concluimos também que, a associação de sequências de telômeros-rDNA 18S nas duas populações de *C. johanna* pode constituir hot spot de recombinação, favorecendo a ocorrência de rearranjos, e que a atividade dos sítios de rDNA, nessa espécie, pode estar sujeita a competição entre cromossomos nucleolares.

Através da primeira descrição cariotípica de *Crenicichla* sp. “Xingu I” observamos uma fórmula cariotípica semelhante à provável organização cariotípica ancestral de Cichlidae, segundo dados da literatura.

Devido as suas peculiaridades do ponto de ecológico e a presença ao longo de toda América do Sul, *Crenicichla* possui participação significativa em diversas teias alimentares. Portanto, a melhor compreensão do patrimônio genético e da dinâmica gênica deste gênero torna-se importante para a preservação dessas espécies e de suas relações ecológicas dentro das comunidades naturais.

6- REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. R. R.; MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R.; NORONHA, R. C. R.; NAGAMACHI, C. Y.; COSTA, M. J. R.; PARDAL, P. P. O.; COELHO J. S.; PIECZARKA, J. C. Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones , Buthidae). **BMC Genetics**, p. 1–11, 2017. BMC Genetics.
- ALVES-COSTA, F. A.; MARTINS, C.; MATOS, F. D. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; WASCO, A. P. 5S rDNA characterization in twelve Sciaenidae fish species (Teleostei, Perciformes): Depicting gene diversity and molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1 SUPPL. 1, p. 303–307, 2008.
- ARAI, R. **Fish karyotypes: a check list**. Springer, Tokyo, 2011.

- ASHLEY, T.; WARD, D. C. A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 62, n. 2–3, p. 169–171, 1993.
- AVILA, M. A. *Crenicichla* sp. “Xingu I.” Disponível em: <http://www.aquahobby.com/gallery/e_creni.php>. Acesso em: 9/2/2018.
- BARROS, A. V. DE; SCZEPANSKI, T. S.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, v. 322–323, p. 47–50, 2011.
- BENZAQUEM, D. C.; FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; GROSS, M. C.; ZUANON, J. A. S. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1 SUPPL. 1, p. 250–255, 2008.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 7, p. 103–120, 1978.
- BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins : an effect of ssDNA secondary structure. , v. 27, n. 2, p. 596–600, 1999.
- BOUJARD, T. **Poissons de Guyane** : guide écologique de l’Approuague et de la Réserve des Nouragues, 1997.
- CASCIOTTA, J.; ALMIRÓN, A.; PIÁLEK, L.; GÓMEZ, S.; RÍCAN, O. *Crenicichla ypo* (teleostei: Cichlidae), a new species from the middle paraná basin in misiones, argentina. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 643–648, 2010.
- CASCIOTTA, J. R.; ALMIRÓN, A. E.; GÓMEZ, S. E. *Crenicichla yaha* sp. n. (Perciformes:Labroidei:Cichlidae), a new species from the río Iguazú and arroyo Urugua-í basins , northeastern Argentina. **Zoologische Abhandlungen**, v. 56, p. 107–112, 2006.
- CHAKRABARTY, P. Cichlid biogeography: Comment and review. **Fish and Fisheries**, v. 5, n. 2, p. 97–119, 2004.
- CHAO, N. L. Ornamental fish resources of Amazonia and aquatic conservation. **OFI Journal, part 1. Species diversity**, v. 12, p. 241–260, 1995.

- CIOFFI, M. DE B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 197–221, 2012.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.; BERTOLLO, L. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. **Fish adaptations**, p. 285–308, 2003.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; ALVES-BRINN, M. N.; MENDONÇA, M. N. C.; BENZAQUEM, D. C. B chromosomes in Amazonian cichlid species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2–4, p. 195–198, 2004.
- FERREIRA, I. A.; POLETTO, A. B.; KOCHER, T. D.; MOTA-VELASCO, J. C.; PENMAN, D. J.; MARTINS, C. Chromosome Evolution in African Cichlid Fish : Contributions from the Physical Mapping of Repeated DNAs. , p. 314–322, 2010.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annu Rev Genet.**, v. 41, p. 331–368, 2007.
- GANTE, H. F.; SALZBURGER, W. Evolution: Cichlid models on the runaway to speciation. **Current Biology**, v. 22, n. 22, p. R956–R958, 2012.
- GENNER, M. J.; SEEHAUSEN, O.; LUNT, D. H.; JOYCE, D. A.; SHAW, P. W.; CARVALHO, G. R.; TURNER, G. F. Age of Cichlids : New dates for Ancient Lake Fish Radiations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1269–1282, 2007.
- GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. January, p. 35–46, 2007.
- HATJE, V.; BIDONE, E. D.; MADDOCK, J. L. Estimation of the natural and anthropogenic components of heavy metal fluxes in fresh water Sinos river, Rio Grande do Sul State, South Brazil. **Environmental Technology**, v. 19, n. 5, p. 483–487, 1998.
- HERNÁN LÓPEZ-FERNÁNDEZ, KIRK O. WINEMILLER, R. L. H. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 1070–1086, 2010.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**, v. 63, p. 1014–1015, 1980.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3S, p. 245–254, 2003.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60–72, 2014.

KULLANDER, S. O. Cichlid fishes from the La Plata basin. Part 2. *Apistogramma commbrae* (Regan, 1906) (Teleostei: Cichlidae). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 89, n. 1, p. 33–48, 1982.

KULLANDER, S. O. Cichlid fishes: Behaviour, ecology and evolution. In: L. C. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM (Ed.); **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS ed., p.461–498, 1998. Porto Alegre - RS.

KULLANDER, S. O. Family Cichlidae. P. 605-654 In: R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris Jr. (ed.) **Check List of the Freshwater Fishes oh South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, 2003.

KULLANDER, S. O.; LUCENA, C. A. S. DE. *Crenicichla gillmorlisi*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from the Paraná river drainage in Paraguay. **Zootaxa**, v. 3641, n. 2, p. 149–164, 2013.

KULLANDER, S. O.; NIJSSEM, H. **The cichlids of Surinam**: (Teleostei:Labroidei), 1989.

KULLANDER, S. O.; NORÉN, M.; FRIDRIKSSON, G. B.; SANTOS DE LUCENA, C. A. Phylogenetic relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South America based on the mitochondrial cytochrome b gene. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, p. 248–258, 2010.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SABDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chomosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201–220, 1964.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. DA S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár Ambient**, v. 8, n. 4, p. 469–484, 2010.

- LIU, W. S.; FREDGA, K. Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. **Chromosome Research**, v. 7, n. 3, p. 235–240, 1999.
- LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain : Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, p. 317–324, 2001.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., HONEYCUTT, R.L., STIASSNY, M.L.J., WINEMILLER, K. O. Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes: Cichlidae). **zoologica scripta**, v. 34, p. 627–651, 2005.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., HONEYCUTT, R.L., WINEMILLER, K. O. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). **molecular phylogenetics and evolution**, v. 34, p. 227–244, 2005.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biol. f. Linn. Soc.**, p. 51–75, 1969.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. 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**. Croom Helm ed., p.61–85, 1991. London.
- LUCENA, C. A. S. DE. Two new species of the genus *Crenicichla* Heckel, 1840 from the upper rio Uruguay drainage (Perciformes: Cichlidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 4, p. 449–456, 2007.
- MARGARIDO, V. P.; GALETTI P.M., J. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 569–573, 2000.
- MARTINS, I.C.; PORTELLA-CASTRO, A. J. J. H. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. **Cytologia**, v. 60, p. 223–231, 1995.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WRIGHT, J. M.; FORETI, F. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia

- (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, n. 1, p. 78–85, 2002.
- MATTOS, J. L.; SCHINDLER, I.; OTTONI, F. P.; CHEFFE, M. M. A new species of *Crenicichla* from the upper Rio das Antas basin, dos Patos lagoon system, southern Brazil (Teleostei: Cichlidae). **Vertebrate Zoology**, v. 64, n. 1, p. 35–42, 2014.
- MERLO, M. A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J. L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA Horizontal Transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BMC Evolutionary Biology**, 2012.
- MIZOGUCHI, S. M. H. K.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguaçu River. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 650–656, 2007.
- MOLINA, W. F.; PACHECO, G. A.; BERBEL FILHO, W. M. Padrões Citogenéticos de Duas Espécies de ciclídeos de Bacias do Semi-Árido do Brasil: *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, p. 33–39, 2014.
- MONTAÑA, C. G.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; TAPHORN, D. C. A new species of *Crenicichla* (Perciformes: Cichlidae) from the Ventuari River, Upper Orinoco River Basin, Amazonas State, Venezuela. **Zootaxa**, p. 33–40, 2008.
- MONTEIRO, M. ***Crenicichla regani***. Disponível em: <http://www.ciclideos.com/crenicichla-regani-f232.html>. Acesso em: 09/02/2018.
- NAKAJIMA, R. T.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; VENERE, P. C.; MARTINS, C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, p. 198, 2012.
- NAMEKAWA, S. H.; VANDEBERG, J. L.; MCCARREY, J. R.; LEE, J. T. Sex chromosome silencing in the marsupial male germ line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p. 9730–9735, 2007.
- OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2–3, p. 114–125, 2013.

- OYHENART-PEREIRA; M. F.; LUENGO, J. A.; BRUM-ZORRILLA, N. Estudio citogenético de *Cichlasoma facetum* (Jemyns) y *Crenicichla sexatilis* (LINN) (Teleostei, Cichlidae). **Rev. Biol. Uruguay**, p. 29–36, 1975.
- PAÇO, A.; CHAVES, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A.; ADEGA, F. The involvement of repetitive sequences in the remodelling of karyotypes : The *Phodopus* genomes (Rodentia, Cricetidae). **Micron**, 2012.
- PERAZZO, G.; NOLETO, R. B.; VICARI, M. R.; MACHADO, P. C.; GAVA, A.; CESTARI, M. M. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 3, p. 509–515, 2011.
- PIÁLEK, L.; ŘÍČAN, O.; CASCIOTTA, J.; ALMIRÓN, A. Zootaxa, *Crenicichla hu*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from the Paraná basin in Misiones, Argentina. **Zootaxa**, v. 46, p. 33–46, 2010a.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 9, p. 2934–8, 1986.
- PINTO, A. G. N.; HORBE, A. M. C.; SILVA, M. DO S. R.; MIRANDA, S. A. F.; PASCOALOTO, D.; SANTOS, H. M. C. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 627–638, 2009.
- PIRES, L. B.; SAMPAIO, T. R.; DIAS, A. L. Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *crenicichla lepidota*: New report in the family Cichlidae. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 3, p. 289–295, 2015.
- RAMIREZ, S. A.; SINCLAIR, A. N. D. J. H. Ribosomal Gene Localization and Distribution (Arrangement) within the Nucleolar Organizer Region of *Zea mays*. **Genetics**, v. 80, n. 984, p. 505–518, 1975.
- ROUSSELET, J.; MONTI, L.; AUGER-ROZENBERG, M. A.; PARKER, J. S.; LEMEUNIER, F. Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 267, n. 1455, p. 1819–23, 2000.
- ROVATSOS, M. T.; MARCHAL, J. A.; ROMERO-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, F. J.;

GIAGIA-ATHANOSOPOULOU, E. B.; SÁNCHEZ, A. Rapid , independent , and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. **Chromosome Research**, p. 869–882, 2011.

SALVADORI, S.; DEIANA, A. M.; ELISABETTA, C.; FLORIDIA, G.; ROSSI, E.; ZUFFARDI, O. Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. **Chromosome Research**, v. 3, n. 1, p. 54–58, 1995. SANTOS, G.M.; JEGU, M.; MERONA, B. **Catálogo de Peixes Comerciais do Baixo Rio Tocantins**. Projeto Tu ed. Manaus, 1984.

SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; TERCENIO, M. L.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: The role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 201–214, 2013.

SMITH, W. L.; CHAKRABARTY, P.; SPARKS, J. S. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). **Cladistics**, v. 24, p. 625–641, 2008.

SOUZA, G.; VANZELA, A. L. L.; CROSA, O.; GUERRA, M. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 157–166, 2016. Springer International Publishing.

SPARKS, J. S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 599–614, 2004.

SPARKS, J. S.; SMITH, W. L. W. L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**, v. 20, p. 501–517, 2004.

STIASSNY, M. L. J. Phylogenetic intrarelationship of the family Cichlidae. **Keenleyside MHA**, 1991.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v. 74, p. 304–306, 1972.

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, Z.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; RÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: An extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–11,

2013.

VANDEGEHUCHTE, M. B.; JANSSEN, C. R. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 3, p. 607–624, 2011.

VARELLA, H. R.; KULLANDER, S. O.; LIMA, F. C. T. *Crenicichla chicha*, a new species of pike cichlid (Teleostei: Cichlidae) from the rio Papagaio, upper rio Tapajós basin, Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 2, p. 233–244, 2012.

VIANA, P. F.; RIBEIRO, L. B.; SOUZA, G. M.; CHALKIDIS, H. M.; GROSS, M. C.; FELDBERG, E. Is the Karyotype of Neotropical Boid Snakes Really Conserved? Cytotaxonomy, Chromosomal Rearrangements and Karyotype Organization in the Boidae Family. **PLoS ONE**, p. 1–16, 2016.

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 janaeiroensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 67–72, 2008.

VIEIRA, F. G.; MATSUZAKI, A. A.; BARROS, B. S. F.; OHARA, W. M.; PAIXÃO, A. C.; TORRENTE-VILARA, G.; ZUANON, J.; DORIA, C. R. C. **Catálogo de peixes da ESEC Cniã**. Porto Velho - RO, 2016.

VOLFF, JN; KÖRTING, C; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 1673–1684, 2000.

VOLTOLIN, T. A.; MENDONÇA, B. B.; FERREIRA, D. C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosomal location of retrotransposable *REX 1* in the genomes in five *Prochilodus* (Teleostei:Characiformes:Prochilodontidae) species. **Mobile Genetic Elements**, v. 3, n. 4, p. 8–11, 2013.