

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DÉBORA REGINA ALMEIDA SANT'ANA

**Estudos citogenéticos convencionais e moleculares em
Megaleporinus obtusidens (Characiformes, Anostomidae): uma
revisão bibliográfica**

Mundo Novo - MS

Novembro/2018

DÉBORA REGINA ALMEIDA SANT' ANA

**Estudos citogenéticos convencionais e moleculares em
Megaleporinus obtusidens (Characiformes, Anostomidae): uma
revisão bibliográfica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Mundo Novo – MS

Novembro/2018

DÉBORA REGINA ALMEIDA SANT' ANA

**Estudos citogenéticos convencionais e moleculares em
Megaleporinus obtusidens (Characiformes, Anostomidae): uma
revisão bibliográfica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM 03 de dezembro de 2018

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes - Orientador - UEMS  _____

Prof. Dra. Valéria Flávia Batista da Silva - UEMS  _____

Prof. Dr. Diovani Piscor - UEMS  _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a colaboração de todos da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes pela paciência e saber.

Agradeço muitíssimo a meus pais, que me ajudaram sempre e me apoiaram, do jeito deles. Também serei grata pelas pessoas que me ajudaram nestes anos, como meu marido Lesley e as muitas amigas que me apoiaram ao longo deste tempo.

Dois e Dois são Quatro

*Como dois e dois são quatro
Sei que a vida vale a pena
Embora o pão seja caro
E a liberdade pequena
Como teus olhos são claros
E a tua pele, morena
como é azul o oceano
E a lagoa, serena*

*Como um tempo de alegria
Por trás do terror me acena
E a noite carrega o dia
No seu colo de açucena*

*- sei que dois e dois são quatro
sei que a vida vale a pena
mesmo que o pão seja caro
e a liberdade pequena.*

Ferreira Gullar (1930-2016)

RESUMO

O presente estudo visa revisar a bibliografia do peixe conhecido atualmente como *Megaleporinus obtusidens* antes conhecido como *Leporinus obtusidens*, através da literatura disponível em sites que forneçam trabalhos realizados neste peixe e em sua família, foram colhidas as informações e organizadas no texto abaixo. Esta espécie pertence à família Anostomidae, uma das mais diversas da ordem Characiformes que apresenta habitats diversos, com ampla distribuição nas Américas. Estes peixes são muito conhecidos por seu valor comercial, por ter carne qualificada para consumo. Com relação aos estudos citogenéticos, *M. obtusidens*, assim como, as outras espécies da família, apresentam um número diploide de 54 cromossomos, distribuídos em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com número fundamental de 108. Assim, demonstra uma estabilidade e conservação do número de cromossomos durante evolução deste grupo de peixes. Em *M. obtusidens*, destaca-se a presença de um par de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, bem evidentes após a técnica de banda-C e por FISH de sondas obtidas do cromossomo W. A alteração de nome de *Leporinus* para *Megaleporinus* deve-se a uma descoberta de uma ancestralidade e por fatores moleculares em seus cromossomos sexuais, dividindo-o em dois grupos: *Leporinus*, que não apresentam cromossomos sexuais como dimorfismo sexual e *Megaleporinus*, que apresentam cromossomos sexuais. Os estudos revelaram que houve manutenção do número diplóide e que os cromossomos sexuais indicam a ancestralidade e monofilia entre *M. obtusidens* e outras espécies da família, também há a necessidade de mais estudos sobre este peixe.

Palavras-chave: Citogenética, Cromossomos sexuais, Banda-C, DNAr 5S, DNAr 18S.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Objetivos	8
Objetivo geral	8
Objetivos específicos	8
3. Metodologia	9
4. Desenvolvimento	9
4.1 Estudos citogenéticos na família Anostomidae	9
4.2 Estudos citogenéticos convencionais em <i>Megaleporinus obtusidens</i>	18
4.3 Estudos citogenéticos moleculares em <i>Megaleporinus obtusidens</i>	20
5. Conclusão	23
Referências	24

1. Introdução

A ordem Characiformes apresenta o maior número de famílias de peixes de água doce da América do Sul, compreendendo 1.674 espécies distribuídas em 270 gêneros (BARROS, 2017). Segundo o mesmo autor, englobam peixes com grande variação de tamanho, com comprimento de 15 milímetros a 100 centímetros; apresentam também variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna, também são importantes como meio comercial, de subsistência, aquariofilia e na ecologia de ecossistemas.

Dentre os Characiformes, a família Anostomidae possui cerca de 150 espécies de peixes e 12 gêneros, registradas na América do Sul e Central (BORBA, 2013) e algumas de suas espécies apresentam carne própria para consumo, importantes para a pesca e aquicultura (GUIDELLI, 2006). Apresentam uma diversidade de formas, vivem em variados tipos de ambientes aquáticos de água doce e exibem ampla diversidade de itens em sua dieta, que inclui de detritívoros e herbívoros a predadores piscívoros (GOMES, 2008). Podem ser distinguidos pelo corpo alongado, nadadeira anal curta com 10 raios ramificados membranas branquiais unidas ao istmo, narina anterior formando um tubo, uma série de dentes com três ou quatro dentes em cada pré-maxilar ou dentário e ausência de dentes no palato (SANTOS, 2007)

O gênero *Leporinus* é um dos mais numerosos desta família, com aproximadamente 90 espécies válidas (POLTRONIERI et al, 2013), sendo considerado um dos gêneros mais diversos (MALAVER, 2015). Os habitats e biótipos aquáticos que estes peixes ocupam são variados, incluem lagos, rios e córregos; há também espécies exclusivas da bacia amazônica com alta diversidade na família (BARROS, 2017).

Em *Leporinus*, a espécie *Leporinus obtusidens*, conhecida popularmente como “piapara”, também se destaca por sua importância econômica (CHEDID, 2012). Como classificação anatômica esta espécie possui corpo alongado e fusiforme, coloração prateada, três manchas pretas nas laterais do corpo, nadadeiras amareladas, cabeça cônica, focinho arredondado, lábios bem desenvolvidos e pequenos dentes frontais na boca; pode alcançar em média 40 cm de comprimento e 1,5 kg de peso total, representa um importante recurso para pesca profissional e esportiva devido à qualidade de sua carne e por ser uma espécie predadora (HARTZ, 2003).

Segundo Ramirez et al (2017), a espécie antes conhecida por *Leporinus obtusidens* teve sua nomenclatura alterada para *Megaleporinus obtusidens*, devido a apresentar uma combinação única de três dentes unicúspides, dentição com duas ou mais cúspides e corpo com uma ou quatro manchas medianas escuras; incluindo também a cabeça e corpo alongados com maior profundidade na origem da nadadeira dorsal subterminal e apresentam como dimorfismo sexual, a primeira costela mais alongada, curvada e ligeiramente mais espessa.

A citogenética tem contribuído acentuadamente para um melhor conhecimento da diversidade de peixes, uma vez que estudos citogenéticos exercem papel preponderante no entendimento dos processos de isolamento reprodutivo e especiação. Além disso, tais estudos têm apresentado uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos em peixes, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies/populações. Assim, a observação de muitas dessas mudanças cromossômicas propõe o estabelecimento de um número maior de espécies do que a quantidade de tipos registrados taxonomicamente.

Diante disso, o presente trabalho teve o intuito de realizar uma revisão bibliográfica sobre os estudos citogenéticos convencionais e moleculares de *M. obtusidens*, a fim de auxiliar nos estudos citotaxonômicos neste grupo de peixes. O motivo da escolha deste tipo de trabalho deve-se a uma afinidade já existente pelo peixe devido há outros trabalhos realizados anteriormente, e notou-se a necessidade de realizar um levantamento bibliográfico sobre esta espécie para futuros estudos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento a partir de registros bibliográficos sobre estudos citogenéticos convencionais e moleculares de *M. obtusidens*, a fim de facilitar os estudos citotaxonômicos e evolutivos deste grupo de peixes.

2.2 Objetivos específicos

- Levantar informações através de pesquisas online em sites de buscas de artigos científicos, como: Google acadêmico (Google Scholar), Scientific Eletronic Library Online (SciELO), Web of Science (anteriormente conhecido como Web of Knowledge).

- Descrever os estudos citogenéticos já realizados para a família Anostomidae.
- Descrever os estudos citogenéticos convencionais e moleculares já realizados em *M. obtusidens*.

3. Metodologia

Para realização deste trabalho foram realizadas pesquisas online em sites de buscas de artigos científicos, como o Google acadêmico (Google Scholar), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Web of Science (anteriormente conhecido como Web of Knowledge), para levantamento de informações citogenéticas convencionais e moleculares sobre a família Anostomidae e de *M. obtusidens*, obtendo assim o máximo de informação sobre a citogenética deste grupo de peixes. A seleção dos artigos foi realizada utilizando a seguinte combinação de palavras, tanto em português como em inglês: cromossomos (chromosomes), cariótipo (karyotype), *Leporinus*, *Leporinus obtusidens*, Characiformes.

4. Desenvolvimento

4.1 Estudos citogenéticos na família Anostomidae

Pesquisas citogenéticas na família Anostomidae (Teleostei, Characiformes) tiveram seu início nos anos 80, desde então, observa-se estabilidade cromossômica na organização cariotípica, com número diplóide constante de $2n = 54$ cromossomos e presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com o número fundamental (NF) igual a 108, em todas as espécies (KOELLER, 1997), como exemplificado na Figura 1 que é um cariótipo consenso entre as espécies de *M. obtusidens*, *M. elongatus*, *M. macrocephalus* (SILVA, 2012).

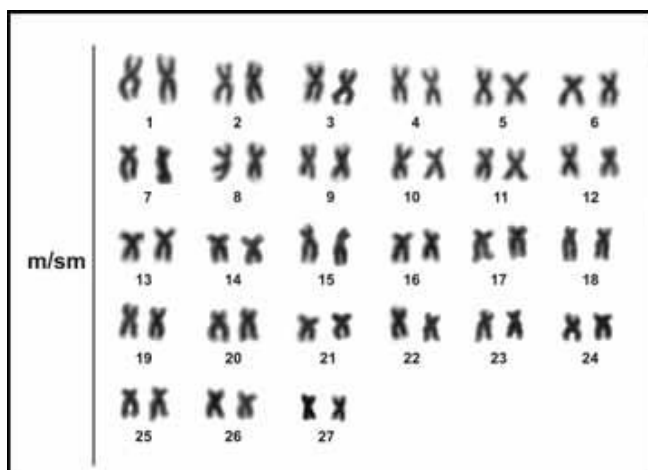


Figura 1. Cariótipo consenso de *Megaleporinus obtusidens*, *Megaleporinus elongatus* e *Megaleporinus macrocephalus* (SILVA, 2012).

Dados de 39 espécies de 8 gêneros diferentes corroboram com esta estabilidade de número diploide em Anostomidae, conforme Tabela 1 extraída do trabalho de Barros (2017). Assim, confirmando uma conservação do número de cromossomos durante a evolução deste grupo de peixes.

O estudo com a região organizadora de nucléolo (RON) revelou um único par cromossômico marcado, demonstrando sistema de RON simples, porém com importância em ser um marcador espécie-específico devido a sua posição no par cromossômico em cada cariótipo, por se encontrar em cada espécie em um par diferente (Tabela 1). Por exemplo, no estudo realizado por Molina et al. (2007), exemplificado na Figura 2 (de mesmo autor), a RON apresentou-se na região telomérica no braço curto do primeiro par cromossômico em *M. obtusidens*, já em *M. elongatus* e *M. reinhardti* esta região apresentou-se nos braços curto e longo, respectivamente, do quinto par cromossômico. Por outro lado, em *Megaleporinus trifasciatus* e *Leporinus friderici* apresentaram-se com sistema de RONs múltiplas, variando de 1 a 5 cromossomos portadores desta região (KOEHLER et al. 1997; GALETTI et al. 1995).

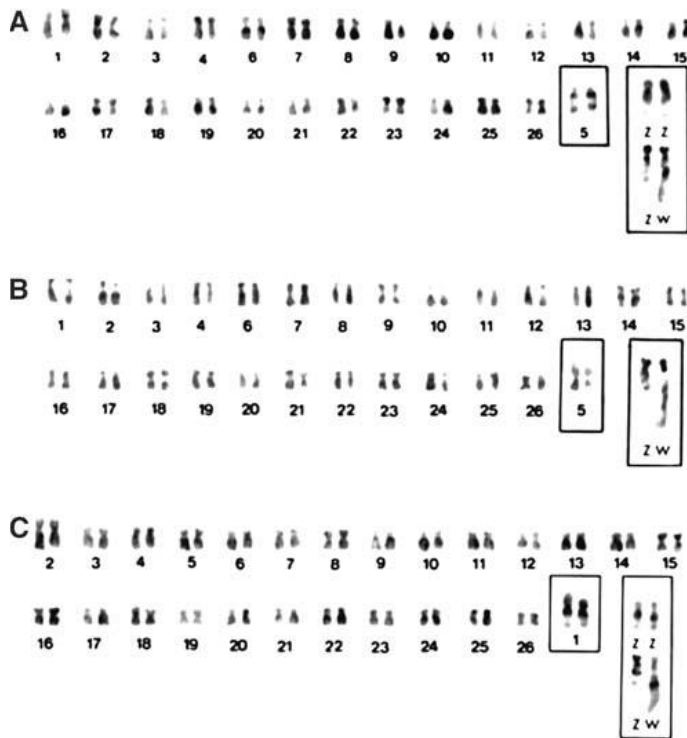


Figura 2. *Megaleporinus elongatus* (A); *Megaleporinus reinhardti* (B) e *Megaleporinus obtusidens* (C) ($2n = 54$ cromossomos). Os pares de com RON e cromossomos ZW são mostrados em detalhes. (MOLINA et al. 2007)

A presença do cromossomo sexual ZW é uma característica que auxilia na diferenciação dos gêneros *Megaleporinus* e *Leporinus*, no caso do gênero *Leporinus* não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, e do gênero *Megaleporinus* os cromossomos sexuais (MOLINA et al., 2007). A presença de cromossomos sexuais na família é observada, com heteromorfismo cromossômico sexual, do tipo ZZ/ZW, nota-se em sete espécies de *Megaleporinus*, identificando que há um grande vínculo entre os cromossomos sexuais e a heterocromatina constitutiva, que é decisivo na diferenciação do cromossomo W (GALLETI E FORESTI, 1986). Autores consideram esta característica na heteromorfia dos cromossomos sexuais dos mesmos como uma sinapomorfia (MALAVER, 2015), ou seja, manteve-se esta característica ao longo da evolução deste gênero.

Sugere-se que a similaridade que os cromossomos sexuais demonstram entre si possui uma origem comum, propondo que o acúmulo de heterocromatina poderia indicar o início da diferenciação destes cromossomos sexuais; inferindo que este processo continua em evolução em *Leporinus*; porém há casos com em *Leporinus* sp2, este padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva ocorre em cromossomos homólogos do tipo metacêntrico, apresentando assim uma distinção morfológica entre os cromossomos Z e W (SILVA, 2012).

Segundo Santos (2007), os estudos realizados por DNA mitocondrial com 17 espécies de *Leporinus* na bacia do Rio Prata e da bacia do São Francisco demonstram que o grupo é monofilético, mas em relação à divisão pelos padrões de coloração não é possível se comparada a outros trabalhos, também não há padrão através da dentição, reforçando que não são caracteres filogeneticamente informativos. Por exemplo, neste mesmo trabalho, o agrupamento filogenético, de acordo também com a coloração e dentição, é o grupo formado por *L. lacustris*, *L. friderici* e *L. piau*, pois apresentam quatro dentes em cada maxila e um padrão de coloração com uma, duas ou três manchas grandes, castanho-escuros, sobre a linha lateral, com ou sem barras transversais escuras e irregulares sobre o dorso.

Malaver (2015) confirmou que a família Anostomidae é um grupo monofilético e possui forte sustentação em suas análises, corroborando com Ramirez et al (2017) em que reforça a hipótese da monofilia do clado com cromossomos sexuais e mais 22 sinapormofias.

Através de estudos de organização genômica de DNA repetitivo, *LeSpe I* e *LeSpe II*, obtidos em oito espécies da família Anostomidae (*M. elongatus*, *M. macrocephalus*, *M. obtusidens*, *L. striatus*, *L. lacustris*, *L. friderici*, *Schizodon borellii* e *S. isognathus*), identificou no primeiro elemento encontrado em apenas *M. elongatus*, *M. macrocephalus* e *M. obtusidens*, que são espécies que possuem cromossomos sexuais diferenciados, aparentemente responsáveis pela origem do cromossomo sexual múltiplo de *M. elongatus*; já o segundo elemento encontrado nos demais, com seus cromossomos sexuais diferenciados ou não (PARIZE-MALTEMPI et al. 2007; SILVA et al. 2012).

O estudo com a sequência de DNA, utilizando a sonda U2 snRNA em *Megaleporinus* demonstra aglomerados na região pericentromérica em um par de cromossomos. Como esta sequência foi vista em outros gêneros da família Anostomidae, considera-se uma proximidade filogenética entre eles (PONZIO et al. 2017).

As relações de estudos comparativos entre os Anostomidae, Chilodontidae, Prochilodontidae e Curimatidae demonstram um grupo monofilético, em que Anostomidae e Chilodontidae formam um clado, Curimatidae e Prochilodontidae formam outro clado. O primeiro sendo unido por 15 sinapormofias e dentro de Anostomidae seus gêneros são unidos por 15 sinapormofias. (VARI, 1983).

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis na literatura para a família Anostomidae. n= número haploide, 2n= número diploide, FC= fórmula cariotípica, m= metacêntrico, sm= submetacêntrico, st= subtelocêntrico, RON= região organizadora de nucléolo, H. sexual= heteromorfismo sexual. (BARROS, 2017)

*A nomenclatura dos peixes foram alterados de acordo com o trabalho de Ramirez et al (2017).

ESPÉCIE	N	2N	FC	RON	H. SEXUAL	LOCAL	REFERÊNCIAS
<i>Abramites hypselonotus</i>	27	54				Amazônia	Scheel 1973
<i>Abramites hypselonotus</i>		54	30m+22sm+2st			Argentina	Oliveira et al.1988; Fenocchio et al.2003.
<i>Abramites hypselonotus</i>		54	54 m/sm	2		Tocantins/Araguaia/A	Martins et al. 2000
<i>Anostomus anostomus</i>	27	54	54 m/sm			América do Sul	Scheel 1973; Ojima et al. 1976
<i>Anostomus anostomus</i>		54	54 m/sm			Amazônia	Hinegardner e Rosen 1972
<i>Anostomus anostomus</i>		54	54 m/sm			Amazônia	Ojima et al. 1976
<i>Anostomus anostomus</i>		54	m/sm			Aquarista/AM	Cestari et al. 1990
<i>Anostomus ternetzi</i>		54	54 m/sm	2		Tocantins/Araguaia/A	Scheel 1973; Martins et al. 2000b
<i>Laemolyta petiti</i>		54	54 m/sm			Rio Araguaia/MT	Venere 1998
<i>Laemolyta taeniata</i>		54	54 m/sm			Rio Pitinga/AM	Cabral et al. 1995
<i>Leporellus vittatus</i>		54	30m+ 24sm	2		Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Leporinus acutidens</i>		54	28m+26sm			Argentina	Fenocchio et al. 2003

<i>Leporinus affinis</i>		54	54 m/sm			Amazônia	Porto et al. 1992
<i>Leporinus affinis</i>		54	54 m/sm			Tucuruí/PA	Venere 1998
<i>Leporinus amblyrhinchus</i>		54	54 m/sm			Três Marias/MG	Venere e Galetti 1986b
<i>Leporinus brunneus</i>		54	54 m/sm			Porto Velho/RO	Venere e Galetti 1986a
<i>Leporinus conirostris</i>		54	52 m/sm 1st+ 1st	2		São Paulo	Galetti et al. 1995a
<i>Leporinus copelandii</i>		54	26m+ 28sm			Rio Ribeita/SP	Galetti et al. 1984; Bertollo et al. 1986
<i>Leporinus cylindriformes</i>		54	54 m/sm			Porto Velho/RO	Venere e Galetti 1986b
<i>Leporinus cylindriformes</i>		54	26m+ 28sm			Alto Paraguai/MT	Arefjev 1990
<i>Leporinus cylindriformes</i>		54	54 m/sm			Rio Pitinga/AM	Cabral et al. 1995
<i>Leporinus desmotes</i>		54	54 m/sm	2		Tocantins	Margarido e Galetti 2000
* <i>Megaleporinus elongatus</i>		54	26m+ 27sm+ 1st			Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981b
* <i>Megaleporinus elongatus</i>		54	53m+ 1st	2	ZZ/ZW	São Paulo	Molina et al. 1998
* <i>Megaleporinus elongatus</i>		54	25m+28sm+ 1st	2	ZZ/ZW	Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981b
* <i>Megaleporinus elongatus</i>		54	54 m/sm	2	Z1Z1Z2Z2/ Z1W1Z2W2	Rio Mogi- Guaçu/SP	Parise-Maltempi et al. 2007
<i>Leporinus fasciatus</i>		54	54 m/sm			Rio Pitinga/AM	Valentim et al.1996
<i>Leporinus fasciatus</i>		54	54 m/sm			Rio Pitinga/AM	Cabral et al. 1995

<i>Leporinus friderici</i>		54	32m+ 22sm	2		Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Leporinus friderici</i>		54	54 m/sm			Rio Madeira/RO	Galetti et al. 1991a; 1995b
<i>Leporinus friderici</i>		54	54 m/sm	1-5			Koehler et al. 1997
<i>Leporinus granti</i>		54	54 m/sm			Rio Pitinga/AM	Cabral et al. 1995
<i>Leporinus aff. holostictus</i>	27		54 m/sm				Scheel 1973
<i>Leporinus lacustris</i>		54	30m+ 24sm		ZZ/ZW	Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981b
* <i>Megaleporinus macrocephalus</i>		54	32m+ 21sm+ 1st	2		Rio São Francisco	Galetti e Foresti 1987
* <i>Megaleporinus macrocephalus</i>		54	54 m/sm		ZZ/ZW	Rio Miranda/MS	Galetti 1984
* <i>Megaleporinus macrocephalus</i>		54	54 m/sm		ZZ/ZW	Rio Miranda/MS	Galetti e Foresti 1987
<i>Leporinus aff. lacustris</i>	27	54	54 m/sm			Amazônia	Scheel 1973
<i>Leporinus aff. maculatus</i>	27	54	54 m/sm			Amazônia	Scheel 1973
<i>Leporinus aff. maculatus</i>		54	54 m/sm			Médio Araguaia/MS	Venere e Galetti 1996
* <i>Megaleporinus obtusidens</i>	27		25m+ 28sm+ 1st	2	ZZ/ZW	Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Leporinus octofasciatus</i>		54	32m+ 22sm			Re Lobo/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Leporinus ortomaculatus</i>		54	54 m/sm			Porto Velho/RO	Venere e Galetti 1986a
<i>Leporinus ortomaculatus</i>		54	54 m/sm			Cuiabá/MT	Venere e Galetti 1986a

<i>Leporinus ortomaculatus</i>		54	54 m/sm			Pocone/MT	Venere e Galetti 1986a
<i>Leporinus piau</i>		54	32m+ 22sm			Três Maria São Francisco	Galetti et al. 1984
* <i>Megaleporinus reinhardti</i>		54	32m+ 21sm+ 1st		ZZ/ZW	Rio São Francisco	Galetti e Foresti 1987
<i>Leporinus striatus</i>	27					Rio Mogi- Guaçu/SP	Hinegardner e Rosen 1972
<i>Leporinus striatus</i>		54	28m+ 26sm			Rio Mogi- Guaçu/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Leporinus taeniatus</i>		54	34m+ 20sm			Rio São Francisco/MG	Galetti et al. 1984
* <i>Megaleporinus trifasciatus</i>		54	53m+ sm+1st	2-5	ZZ/ZW	Rodônia/RO	Galetti et al. 1995a
* <i>Megaleporinus trifasciatus</i>		54	22m+31sm+ 1st		ZZ/ZW	Rio Araguaia/AM	Venere et al. 2004
<i>Leporinus sp.</i>		54	32m+ 21sm+1st		ZZ/ZW	Rio Miranda/MS	Galetti e Foresti 1987
<i>Pseudanos trimaculatus</i>		54	54 m/sm	2		Tocantins/Araguaia/AM	Martins et al. 2000b
<i>Rhytidodus microlepis</i>		54	54 m/sm			Manaus/AM	Bertollo et al. 1980
<i>Rhytidodus microlepis</i>		54				Rio Negro/AM	Cabral et al. 1995
<i>Rhytidodus microlepis</i>		54	54 m/sm			Lago Catalão/AM	Cabral et al. 1995
<i>Schizodon borelli</i>		54	32m+22sm	2		Águas São Pedro/SP	Galetti et al. 1984
<i>Schizodon fasciatus</i>		54	54 m/sm			Rio Madeira/RO	Venere e Galetti 1986b
<i>Schizodon fasciatus</i>		54	38m+15sm			Lago Catalão/AM	Valentim et al.1996

<i>Schizodon fasciatus</i>		54	54 m/sm			Rio Solimões/AM	Mestriner e Galetti 1987
<i>Schizodon fasciatus</i>		54	54 m/sm			Rio Paraguai/MS	Mestriner e Galetti 1987
<i>Schizodon fasciatus</i>		54	54 m/sm			Amazônia	Galetti et al. 1991b
<i>Schizodon knerii</i>		54	28m+ 26sm	2		Três Marias/MG	Galetti et al. 1984
<i>Schizodon nasutus</i>		54	32m+ 22sm	2		Rio Mogi-Guaçu/SP	Galetti et al. 1981a
<i>Schizodon nasutus</i>		54	32+22sm	2		Argentina	Pastori et al. 1997
<i>Schizodon platae</i>		54	54 m/sm			Argentina	Fenocchio et al. 2003
<i>Schizodon vittatus</i>		54	54 m/sm			Mato Grosso/MT	Martins et al. 1997

4.2 Estudos citogenéticos convencionais em *Megaleporinus obtusidens*

Os *Megaleporinus* apresentam o mesmo número de cromossomos ($2n=54$) (POLTRONIERI et al. 2013), que foram confirmados com a técnica de Giemsa, banda-C e Ag-NOR (MARTINS e GALETTI, 1999), e geralmente com somente um par de cromossomos com regiões organizadoras de nucléolo, existindo um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, sendo bem descrita em *Megaleporinus obtusidens* (VENERE, 2004). A RON mostrou banda-C positiva em *Megaleporinus obtusidens* da população do dos rios Mogi-Guaçu e Piracicaba, perto de Luis Antônio no estado de São Paulo (KOEHLER, 1997). Por outro lado, em uma população de *M. obtusidens* do rio Mogi-Guaçu foram detectadas a RON no braço curto em posições terminais (GALETTI et al. 1984), e com a técnica de banda-C pode notar que a heterocromatina está praticamente ausente, e quando há a sua coloração é pálida (GALETTI, 1981).

Em *M. obtusidens*, coletados do rio Mogi-Guaçu e Piracicaba no estado de São Paulo, apresentaram as metáfases coradas com Giemsa altamente diferenciados nos cromossomos sexuais das fêmeas, assim como demonstrado na Figura 3 de Koehler (1996); também notaram que as regiões que as RONs e regiões heterocromáticas vizinhas são positivas para banda-C; e estudo com fluorocromo demonstram uma característica do cromossomo sexual Z e W em sua composição molecular, indicando uma maior concentração do conteúdo de GC em *M. obtusidens* (KOEHLER, 1996).



Figura 3. Cariótipos corados por Giemsa de fêmeas (a) e machos (b) *Megaleporinus obtusidens*. Os cromossomos sexuais ZZ / ZW são enquadrados (KOEHLER, 1996).

A diferenciação dos cromossomos sexuais pela heterocromatina, verificada no estudo de Galetti e Foresti (1986) indica que este processo deve-se a heterocromatização do cromossomo Z, e este mesmo tipo de acúmulo, neste caso, resultou na diferenciação do cromossomo W.

As espécies de *Megaleporinus* possuem cromossomos ZW, com cromossomos W diferindo seu conteúdo mitótico, com bandas de replicação com alto nível significativo de complexidade heterocromática como demonstra a Figura 4 (PARIZE-MALTEMPI et al. 2013). No estudo de Barros et al. (2018), apresenta-se separados os grupos destas espécies devido ao cromossomo sexual da seguinte maneira: em *Megaleporinus* incluem *Megaleporinus obtusidens*, *M. reinhardti*, *M. macrocephalus*, *M. trifasciatus*, *M. conirostris* com cromossomos sexuais do tipo ZZ/ ZW e *M. elongatus* com sistema Z1Z1Z2Z2/ Z1W1Z2W2. No entanto *Leporinus multimaculatus*, com sistema ZZ/ ZW, foi mantido no gênero *Leporinus*.

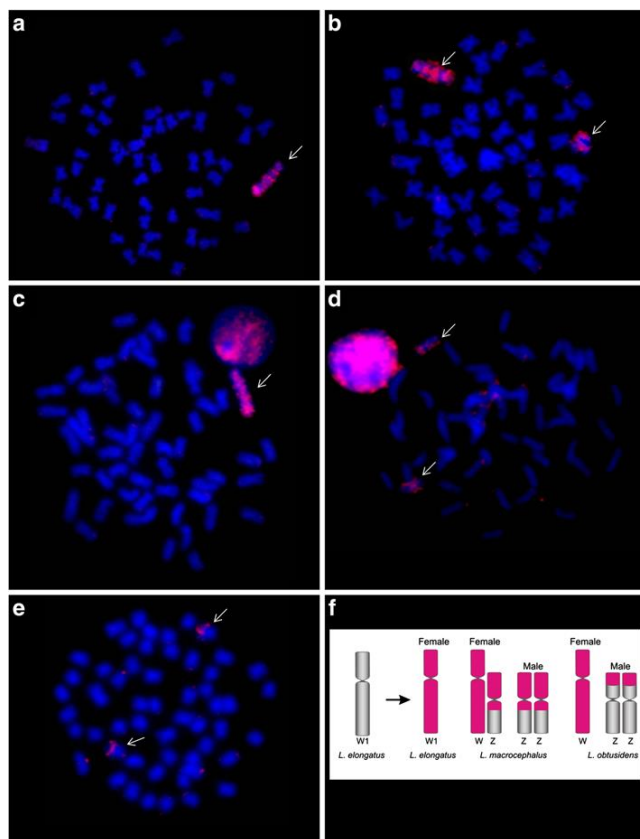


Figura 4. FISH usando sondas do cromossomo W de *M. elongatus* (a) *M. elongatus*; (b) *M. macrocephalus*; (c) *M. obtusidens*; (d) *M. macrocephalus*; (e) *M. obtusidens*; (f) Padrão de hibridização (PARIZE-MALTEMPI et al. 2013).

4.3 Estudos citogenéticos moleculares em *Megaleporinus obtusidens*

Segundo Ferreira et al. (2007), estudos com DNAr 5S confirmam a monofilia, por meio de estudos filogenéticos cromossomos sexuais do animal, uma relação entre o *Megaleporinus obtusidens* e outras quatro espécies se dividindo no grupo *Leporinus* com uma relação evolutiva em comum nestes cromossomos. Também demonstrado por Martins e Galetti (1999), que esta espécie apresenta o 5S próximo à região centromérica do braço longo no par submetacêntrico.

Estudo realizado por Barros et al (2018) demonstra que as espécies de *Megaleporinus* indicam diferentes taxas de evolução devido aos estágios de diferenciação dos cromossomos sexuais, comparados as outras espécies deste gênero. Assim como Parise-Maltempi et al. (2007) já havia demonstrado com o estudo em *M. elongatus*, reforçando a evolução em taxas distintas citada anteriormente.

Com a hibridização *in situ* (FISH), demonstra uma diversidade em interpretação da origem de cromossomos sexuais e supranuméricos e sobre a organização genômica de segmentos cromossômicos específicos (BARROS, 2017). No estudo de Marreta et al (2012), a sonda *LeSpeI* (sequência de DNA isolada via digestão da enzima *SpeI*), revelou sinais positivos no braço longo do cromossomo W em fêmeas de *Megaleporinus obtusidens*, assim como representado na Figura 5 abaixo, neste caso confirma-se uma divisão para o gênero *Leporinus* para o gênero *Leporinus* sp2, porém só foi possível confirmar através de análise citológica que o mesmo apresenta cromossomos heteromórficos.

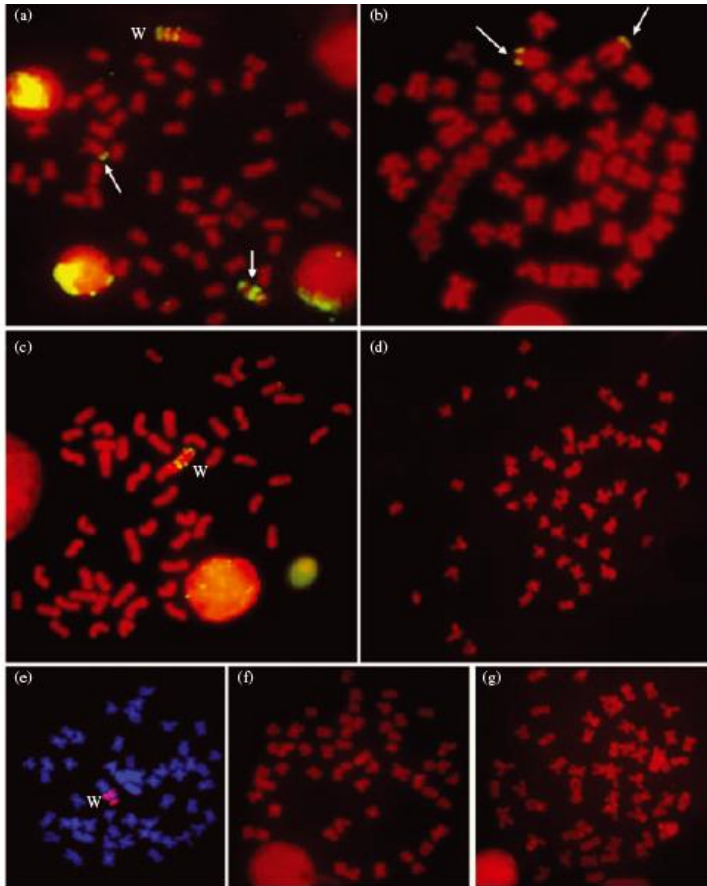


Figura 5- Hibridização *in situ* (FISH) utilizando sonda *LeSpeI*: (a) fêmea e (b) macho *Megaleporinus elongatus*, (c) fêmea e (d) macho *Megaleporinus macrocephalus*, (e) fêmea e (f) macho *Megaleporinus obtusidens* e (g) fêmea *Leporinus friderici* (MARRETA et al, 2012).

Em estudos de pintura cromossômica com a sonda W, pintou-se todo o cromossomo W de fêmeas, nenhum sinal foi detectado em indivíduos do sexo masculino (POLTRONIERI et al. 2013). Segundo Marreta (2012), a sequência (*LeSpe I*) demonstra que esta marcação está diferenciada em machos e fêmeas, sugerindo que esta sequência está relacionada com a diferenciação destes cromossomos, já que em espécies sem diferenciação sexual não foram encontrados marcadores. As sondas W pintaram completamente cromossomos W de indivíduos fêmeas de *M. obtusidens*, já nos machos foi observada próxima à porção terminal de um par de cromossomos metacêntricos correspondente a Z, assim demonstrado na Figura 6 (POLTRONIERI et al. 2013).

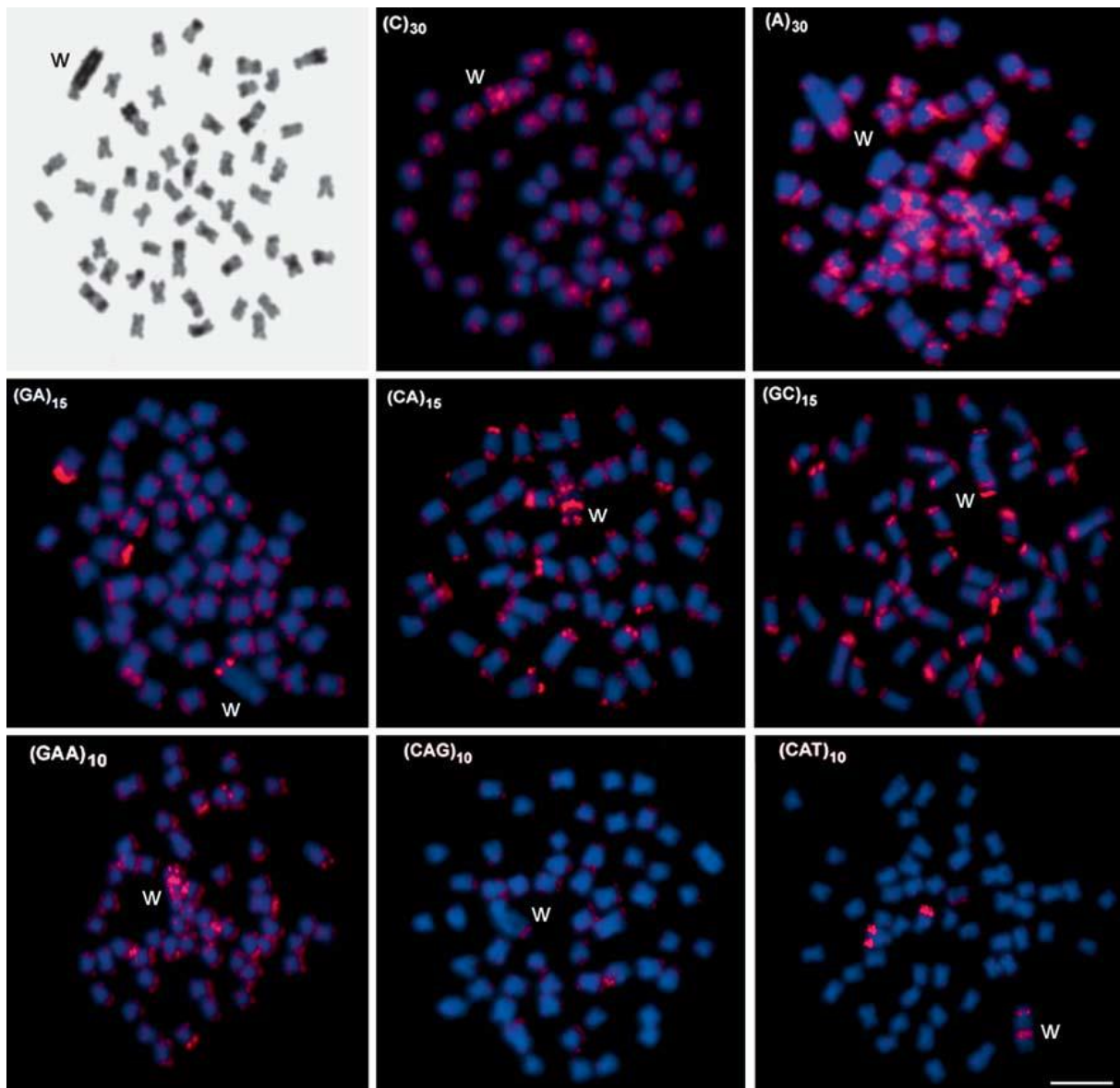


Figura 6. Cromossomos metafásicos mitóticos de uma fêmea de *L. elongatus*. A figura mostra o sistema de cromossomo sexual ZW após a bandagem C e hibridizado com diferentes microssatélites mono-, di- e tri-nucleotídeos. As letras marcam os cromossomos W. Barra = 5 μm (POLTRONIEIRI et al. 2013)

O cromossomo W mostrou padrões de distribuição distintos para essas sequências, em *M. obtusidens* surgiu uma sequência nos longos braços heterocromáticos dos microssatélites, o mesmo confirmado no estudo de Silva (2012). No trabalho de Poltronieri et al. (2013) pode-se observar que (C) 30 e (A) 30, (CA) 15 foi restrita à região centromérica, os microssatélites trinucleotídicos, o (GAA)₁₀ foi amplamente disperso nos braços longos dos cromossomos W, sequência (CAG)₁₀ também mostrou uma distribuição sítios intersticiais em *M. obtusidens*, o microssatélite (CAT)₁₀ foi restrito às regiões teloméricas / centromérica,

indicando assim, que este acúmulo de microssatélites nos cromossomos W nos braços longos, heterocromáticos, sugere uma origem comum com um ancestral autossômico.

Estudos realizados com retrotransposons (*Rex1* e *Rex3*) demonstram sequências com diferentes pares, porém com alta similaridade entre as sequências correspondentes ao elemento *Rex1*, assim, ao utilizar fragmentos do elemento *Rex1* como sonda para análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foi detectada em suas análises que *M. obtusidens* tinha aglomerados isolados nas regiões terminais como demonstra a figura 7-c da maioria dos cromossomos (BORBA, 2013).

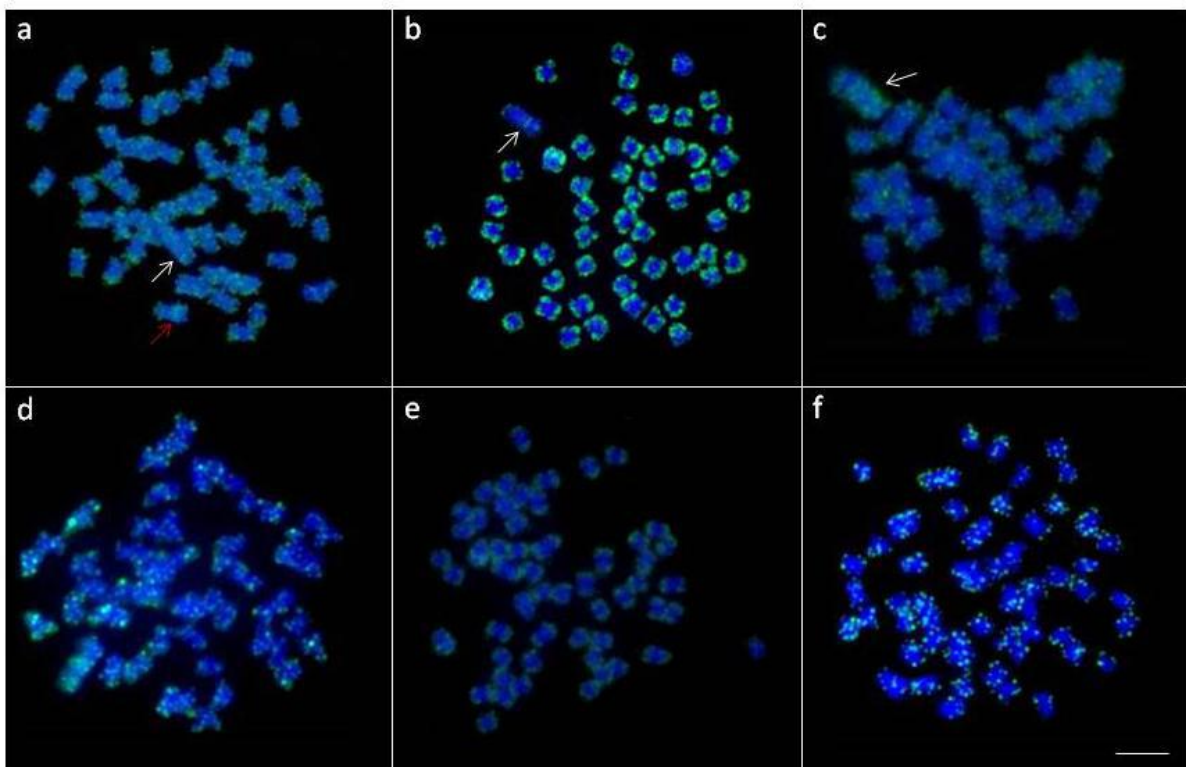


Figura 7- FISH utilizando os fragmentos de PCR do elemento *Rex1* *M. elongatus* (fig. 7a), *M. macrocephalus* (fig. 7b) e *M. obtusidens* (fig. 7c), *L. friderici* (fig. 7d), *L. lacustris* (fig. 7e) e *L. striatus* (fig. 7f) (BORBA,2013).

5. Conclusão

Os estudos em *M. obtusidens* demonstram manter os padrões de número diploide e cromossomos sexuais constantes ao longo dos anos, utilizando os cromossomos sexuais verificaram esta sinapomorfia entre as espécies, e a reclassificação dos gêneros por meio dos cromossomos sexuais indicam que há características ainda não estudadas nestas espécies,

indício da necessidade de novos estudos. Há também características que somente ocorre em populações isoladas de outras bacias, apresentando fatos que ocorre uma evolução e ainda é contínua. Existe muita informação a ser estudada ainda nestes peixes, pois há locais que não foram realizadas nenhuma coleta. A mudança de nome de algumas espécies de *Leporinus* para *Megaleporinus* devido a características físicas únicas corrobora à necessidade de estudos desta espécie.

Referências

BARROS, L. C. Isolamento, caracterização e mapeamento cromossômico de elementos repetitivos em espécies da família Anostomidae (Ostariophysi–Characiformes): análise comparativa em diferentes tipos de águas amazônicas. 2017, Tese (Doutorado), **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA Divisão do curso de pós-graduação em genética, conservação e biologia evolutiva – DIGEN**, Manaus- Amazonas.

BARROS, L. C.; Piscor, D.; Parise-Maltempi, P. P. Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). **Sexual Development**, 2018.

BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P.M. Cytogenetics and taxonomy: consideration based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. 1986.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; GALETTI, P.M.; FERREIRA, I.; MOREIRA-FILHO, O.; FORESTI, F. Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica. I. Ordem Cypriniformes. *Ciências e Cultura (Supl)*. 1980.

BORBA, R. S. Identificação e caracterização de elementos retrotransponíveis da família Rex do genoma de espécies do gênero *Leporinus* SPIX, 1829 (Teleostei: Anostomidae). 2013. Dissertação (Mestrado), **Universidade Estadual Paulista**, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro- SP.

CHEIDID, R. A. Estudo morfológico e histoquímico do tubo digestivo de eleuteroembriões e larvas de *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836). 2012. Dissertação (Mestrado), **Universidade Estadual Paulista**, Centro de Aquicultura. Jaboticabal- SP

FERREIRA, I. A; Oliveira, Claudio; Paulo C; Galetti Jr, Pedro M; Martins Cesar. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Genetica**, v. 129, n. 3, p. 253-257, 2007.

GALETTI JR, P. M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 43, n. 1-2, p. 43-46, 1986.

GALETTI JR, P. M.; FORRESTI, F; BERTOLLO, Luiz A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 29, n. 3, p. 138-142, 1981.

GALETTI, P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. **Caryologia**, v. 37, n. 4, p. 401-406, 1984.

GALETTI, P. M. JR; LIMA, N. R. W. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, n. 4, p. 375-382, 1995.

GOMES, P. C., RIBEIRO, R. P.; BARERO, Nelson Lopera; POVH Jayme Aparecido, VARGAS, Lauro; SIROL, Rodolfo Nardez. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 2, 2008.

GUIDELLI, G.; TAVECHIO, W. L. G.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Fauna parasitária de *Leporinus lacustris* e *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 3, 2006.

HARTZ, S. M.; DE CARVALHO COSTA, Silene; MACHADO, Cristiano Silveira. *Leporinus obtusidens* no Lago Guaíba, RS. 2003.

KOEHLER, M. R.; DEHM, D.; GUTTENBACH, M.; NANDA, I; HAAF, T.; MOLINA, W. F.; GALETTI, P. M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 5, n. 1, p. 12-22, 1996.

MALAVAR, J. L. R. Filogenia molecular dos Anostomidae e filogeografia das espécies com cromossomos sexuais ZZ/ZW do gênero *Leporinus*. 2015. Tese (Doutorado), **Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos-SP.

MARRETA, M. E.; FALDONI, F. L. C.; PARISE-MALTEMPI, Patricia Pasquali. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of fish biology**, v. 80, n. 3, p. 630-637, 2012.

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

MOLINA, W. F.; GALETTI, Pedro Manoel. Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW). **Genetica**, v. 130, n. 2, p. 153-160, 2007.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and genome research**, v. 116, n. 3, p. 218-223, 2007.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; SILVA, Edson Lourenço; RENS, Willem; DEARDESN, Frances, O'BRIEN, Patrícia C. M.; TRIFONOV, Vladimir; FERGUNSON-SMITH, Malcom A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 60, 2013.

POLTRONIERI, J.; MOLINA, W.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 142, n. 1, p. 40-45, 2013.

PONZIO, J. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal locations of U2 snDNA clusters in *Megaleporinus*, *Leporinus* and *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Biologia**, v. 73, n. 3, p. 295-298, 2018.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.O; GALETTI JR, Pedro M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 308-323, 2017.

SILVA, E. L. da. Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de *Leporinus elongatus* em diferentes espécies da família Anostomidae (Teleostei, Characiformes). 2012. Tese (Doutorado), **Universidade Estadual Paulista**, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro-SP.

VARI, R.P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 378: 1-60. 1983.

VENERE, P. C.; FERREIRA, I. A.; GALETTI JR, P. M. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**, v. 121, n. 1, p. 75-80, 2004.