



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO

Aspectos citogenéticos de peixes das famílias Gempylidae e  
Balistidae do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região  
Meso-Atlântica

GLAICON DE SOUSA SANTOS

Natal/RN  
2020



**GLAICON DE SOUSA SANTOS**

**Aspectos citogenéticos de peixes das famílias Gempylidae e  
Balistidae do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região Meso-  
Atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sistemática e Evolução.

**Orientador:** Dr. Wagner Franco Molina

Natal/RN  
2020

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Santos, Glaicon de Sousa.

Aspectos citogenéticos de peixes das famílias Gempylidae e Balistidae do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região Meso-Atlântica / Glaicon de Sousa Santos. - Natal, 2020.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Sistemática e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Franco Molina.

1. Peixes de profundidade - Dissertação. 2. Evolução cariotípica - Dissertação. 3. DNAr - Dissertação. 4. Elementos móveis - Dissertação. 5. DNA repetitivo - Dissertação. I. Molina, Wagner Franco. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 567

**GLAICON DE SOUSA SANTOS**

**Aspectos citogenéticos de peixes das famílias Gempylidae e  
Balistidae do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região Meso-  
Atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sistemática e Evolução.

Aprovado em 04 de Junho de 2020

---

Dr. GIDEÃO WAGNER WERNECK FELIX DA COSTA  
Examinador Externo à Instituição

---

Dr. RODRIGO XAVIER SOARES  
Examinador Externo à Instituição

---

Dr. WAGNER FRANCO MOLINA, UFRN  
Presidente

---

GLAICON DE SOUSA SANTOS  
Mestrando

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

(Bertrand Russell)

“O sucesso é uma consequência e não um objetivo.”

(Gustave Flaubert)

Dedico à meu filho José Lucas, por me inspirar e ser o maior dos incentivos nas horas mais difíceis. Aos meus pais José Ilton e Tânia, pelo apoio incondicional a toda essa trajetória. A vocês todo meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tem feito na minha vida, pelas portas que ele abriu durante toda minha vida e no percurso desta pesquisa e por tudo que é para mim.

Agradeço de todo coração aos meus pais José Ilton dos Santos e Tânia Maria de Sousa Santos, por todo apoio, confiança, carinho e auxílio que me proporcionou em toda minha vida.

Agradeço a minha esposa Maria Amélia, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis dessa trajetória que foram de muita importância para eu chegar até aqui.

Ao meu Tio Jurandir, por ter me ajudado sempre que precisei e pelo apoio que tem me fornecido.

A minha amiga Ana Maria que nunca se ausentou em ajudar quando precisei.

Agradeço ao meu Orientador professor Dr. Wagner Franco Molina, por ter acreditado e confiado nessa pesquisa, e por todo aprendizado concebido.

Um agradecimento especial a meu amigo e parceiro de pesquisa Simião, por toda ajuda, sempre se colocando à disposição a colaborar.

Agradeço também a todos os componentes do Laboratório de Genética de Recursos Marinho, Gideão, Karlla, Ináilson, Aparecida, Vanessa, Josy, Erika, Dalvan e os demais, por toda ajuda que me proporcionaram que foram essenciais para desenvolvimento deste trabalho, sem essa ajuda, nada disso seria possível.

Agradeço aos colegas Max, Elaine, Rita e Dennys por tornarem as viagens diárias até Pendências um momento de conforto e relaxamento mental.

A todos os funcionários da Escola Municipal Terezinha Justo por fazerem as tardes de trabalho momentos agradáveis.

Um agradecimento especial ao meu Vice-Diretor e Diretora, Anderson e Romeika respectivamente por todo apoio e compreensão durante todo o ano letivo de 2019, sem o apoio de vocês tudo teria sido ainda mais difícil.

Aos meus alunos por toda experiência proporcionada durante todo o ano de 2019.

Agradecer também ao pessoal da Escola Municipal Maria Cleófas Moura, em especial a Coordenadora Marione e Diretor Júnior de babá pela compreensão nos

momentos em que precisei me ausentar da escola para se fazer presente na universidade.

A todo o pessoal da TMA (Turma Maria Aparecida) por sempre proporcionar aquela mensagem de apoio e se solidarizarem nos momentos de lamento (kkkk).

Ao grupo do Whatsapp “Temporada 2019” (Jackson, Vinícius, Edgar, Gabriel e Henrique) por proporcionarem o alívio cômico do dia a dia.

A professora Paula coordenadora do curso de especialização em Ensino de Ciências Naturais e Matemática por todo apoio e compreensão para que fosse possível realizar a especialização concomitantemente ao mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Um agradecimento especial ao meu orientador José Garcia Júnior que desde o Tec. em Recursos Pesqueiros, tem me acompanhado na minha vida acadêmica.

A todos que de uma forma direta ou indireta colaboraram para esse momento meus mais sinceros agradecimentos.



## Resumo

Grupos de peixes marinhos, sobretudo aqueles habitantes de ambientes pelágicos ou grandes profundidades, geralmente apresentam grandes lacunas de informações citogenéticas, restringindo seu uso em abordagens evolutivas. Entre esses grupos, famílias pouco diversas como Gempylidae (Scombriformes) com 16 gêneros e 26 espécies meso ou bentopelágicas e de relativa importância na pesca comercial, ainda não possui qualquer informação citogenética. Da mesma forma, a diversificada família Balistidae (Tetraodontiformes), com 42 espécies, apresenta menos da metade das espécies com cariótipos conhecidos. Visando ampliar o conhecimento dos aspectos citogenéticos de peixes marinhos, sobretudo habitantes de ambientes insulares do Atlântico Sul, aqui foram analisadas as espécies *Promethichthys prometheus* e *Ruvettus pretiosus* (Gempylidae) e *Canthidermis maculata* e *C. sufflamen* (Balistidae), provenientes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região meso-Atlântica. As análises citogenéticas empregaram metodologias convencionais (coloração com Giemsa, coloração Ag-RONs e bandamento-C), coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) e mapeamento de sequências repetitivas DNAr 18S, DNAr 5S, sequências microssatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>, transposon *Tol2* e retrotransposon *Rex3*, através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH). *Promethichthys prometheus* e *R. pretiosus* possuem 2n=48 cromossomos, no entanto, divergem consideravelmente quanto à fórmula cariotípica (NF=84 e NF=50), respectivamente. Os padrões de mapeamento das diferentes classes de DNA repetitivo, sugerem no entanto pequena divergência na microestrutura dos cromossomos. Por outro lado, *C. maculata* (2n=44 e NF=56) e *C. sufflamen* (2n=44 e NF=58), exibem cariótipos reduzidos, resultado de fusões *in tandem*, modelados por variações numérico-estruturais dos cariótipos, mas seguida de baixa reorganização interna dos cromossomos. Esses primeiros resultados para a família Gempylidae, indicam marcante diversificação cromossômica estrutural nestes habitantes de águas profundas, enquanto os padrões encontrados nas espécies de Balistidae, corroboram o papel das fusões na sua evolução cariotípica. A ampliação dos dados citogenéticos para estas espécies confirma a notável diversidade cariotípica e tendências carioevolutivas particulares de alguns grupos de peixes marinhos.

**Palavras-chave:** Evolução cariotípica, DNAr, elementos móveis, DNA repetitivo, peixes de profundidade.

## Abstract

Marine fishes, over all those inhabiting on pelagic environments or large depths, they usually have large gaps in cytogenetic information, restricting its use in evolutionary approaches. Among these groups, small families like Gempylidae, with 16 genera and 26 species and relative importance in commercial fishery, didn't have any chromosomal data. Likewise, the family Balistidae, with 42 species, presents less than half of the species with known karyotypes. Aiming to increase the knowledge of the cytogenetic aspects of marine fish, mainly inhabitants of insular regions of the South Atlantic, were analyzed the species *Promethichthys prometheus* and *Ruvettus pretiosus* (Gempylidae) and *Canthidermis maculata* and *C. sufflamen* (Balistidae), from the Archipelago of São Pedro and São Paulo, Meso-Atlantic region. Cytogenetic analysis used conventional methodologies (Giemsa staining, Ag-RON staining and C-banding), staining with base-specific fluorochromes (CMA<sub>3</sub>/DAPI) and repetitive sequence mapping of 18S rDNA, 5S rDNA, microsatellite sequences (CA)<sub>15</sub> and (GA)<sub>15</sub>, transposon *Tol2* and retrotransposon *Rex3*, through fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Promethichthys prometheus* and *R. pretiosus* have 2n=48 chromosomes, however, they differ considerably regarding the karyotype formula (NF=84 and NF=50, respectively). The chromosome mapping of the different classes of repetitive DNA, suggest a small microstructural divergence in the chromosomes. On the other hand, *C. maculata* (2n=44 and NF=56) and *C. sufflamen* (2n=44 and NF=58), exhibit reduced karyotypes, as result of in tandem fusions, followed by a low internal reorganization of the chromosomes. These first results for the Gempylidae family, indicate marked structural chromosomal diversification in these deep-water inhabitants, while the patterns found in the species of Balistidae, corroborate the role of fusions in their karyotype evolution. The expansion of cytogenetic data for these species confirms the remarkable karyotype diversity and particular karyoevolutionary trends of some groups of marine fish.

**Keywords:** Karyotype evolution, DNAr, mobile elements, repetitive DNA, deep-sea fishes.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Representação das zonas oceânicas, de acordo com a profundidade. (Modificado de Colaço *et al.*, 2017). ..... **10**
- Tabela 1.** Dados citogenéticos de espécies de peixes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP)..... **15**
- Figura 2.** Espécies da família Gempylidae utilizadas nas análises citogenéticas. Barra = 12 cm. .... **18**
- Figura 3.** Espécies da família Balistidae utilizadas nas análises citogenéticas. Barra = 4 cm. .... **19**
- Tabela 2.** Primers e sondas utilizados nas análises por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) nos cromossomos de espécies das famílias Gempylidae e Balistidae. .... **23**

### CAPÍTULO 1

- Figura 4.** Mapa com a posição geográfica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo e indivíduos das espécies *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus* (Gempylidae). Barra = 10 cm. .... **29**
- Figura 5.** Cariótipos de *Canthidermis maculata* e *Canthidermis sufflamen* com coloração convencional pelo Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas, sítios Ag-RONs e regiões CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, respectivamente. Barra = 5µm. .... **30**
- Figura 6.** Hibridização fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e microssatélites (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub> em *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*. Barra = 5µm. .... **31**
- Figura 7.** Hibridização *in situ* fluorescente de elementos transponíveis *Tol2* e *Rex3* em *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*. Barra = 5 µm. ... **32**

### CAPÍTULO 2

- Figura 8.** Cariótipos de *Canthidermis maculata* e *Canthidermis sufflamen*, através de coloração convencional com Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas, sítios Ag-RONs e as regiões CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, respectivamente. Barra = 5µm. ... **42**

<b>Figura 9.</b>	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e microssatélites (GA) <sub>15</sub> e (CA) <sub>15</sub> em <i>Canthidermis maculata</i> e <i>Canthidermis sufflamen</i> . Barra = 5µm. ....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente de elementos transponíveis <i>Tol2</i> , <i>Rex3</i> e sequências teloméricas em <i>Canthidermis maculata</i> e <i>Canthidermis sufflamen</i> . Barra = 5 µm. ....	<b>45</b>
<b>Tabela 3.</b>	Dados citogenéticos disponíveis para as espécies da família Balistidae. ....	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**a** – Cromossomo acrocêntrico

**AgNO<sub>3</sub>** – Nitrato de prata

**Ag-RONs** – Regiões organizadoras de nucléolo evidenciadas pela impregnação com nitrato de prata

**ASPSP** – Arquipélago de São Pedro e São Paulo

**AT** – Adenina e Timina

**Ba(OH)<sub>2</sub>.8H<sub>2</sub>O** – Hidróxido de bário

**CMA<sub>3</sub>** – Cromomicina

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DNAr** – Ácido desoxirribonucleico ribossômico

**FISH** – Fluorescence *in situ* hybridization

**GC** – Guanina e Citosina

**HCl** – Ácido clorídrico

**KCl** – Cloreto de potássio

**m** – Cromossomo metacêntrico

**NF** – Número Fundamental

**PCR** – Reação em Cadeia de Polimerase

**RN** – Rio Grande do Norte

**rpm** – Rotações por minuto

**RNAr/rRNA** – Ácido ribonucleico ribossômico

**sm** – Cromossomo submetacêntrico

**SSC** – Solução salina de citrato de sódio

**st** – Cromossomo subtlocêntrico

**ZEE** – Zona Econômica Exclusiva

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Zonação dos ambientes oceânicos .....	<b>15</b>
1.2 Aspectos biológicos da família Gempylidae .....	<b>17</b>
1.3 Aspectos sistemáticos e diversidade da família Balistidae .....	<b>18</b>
1.4 A citogenética como ferramenta para estudos evolutivos .....	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 Objetivo Geral .....	<b>22</b>
2.2 Objetivos Específicos .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Materiais .....	<b>23</b>
3.2 Métodos .....	<b>24</b>
3.2.1 Técnica de preparação de cromossomos mitóticos .....	<b>24</b>
3.2.2 Preparação das lâminas .....	<b>25</b>
3.2.3 Análises cromossômicas .....	<b>26</b>
3.2.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) .....	<b>26</b>
3.2.5 Detecção de heterocromatina constitutiva .....	<b>26</b>
3.2.6 Coloração com fluorocromos base-específicos .....	<b>27</b>
3.2.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>30</b>
Caracterização citogenética de duas espécies da família Gempylidae ( <i>Ruvettus pretiosus</i> e <i>Promethichthys prometheus</i> ) do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região meso-Atlântica .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>43</b>
Similaridades citogenômicas em <i>Canthidermis maculata</i> e <i>Canthidermis sufflamen</i> (Balistidae) e a relação do DNA repetitivo com eventos de redução cariotípica .....	<b>43</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ambientes insulares constituem regiões com grande potencial para diversificação biológica. Nesse cenário oceanográfico, o ASPSP pode ser considerado um “hotspot” de biodiversidade (Vaske *et al.*, 2005; Macedo-Soares *et al.*, 2012), haja vista, que entre as ilha oceânicas brasileiras, é a que apresenta o maior índice de endemismo (9%) quando comparado as demais ilhas como o Arquipélago de Fernando de Noronha (5%) e Trindade/Martin Vaz (5,7%) (Rosa *et al.*, 2016).

Resultante de uma falha transformante da Dorsal Meso-Atlântico, o Arquipélago de São Pedro e São Paulo – ASPSP é o menor conjunto de ilhas oceânicas em território nacional, sendo o ponto brasileiro mais avançado no Oceano Atlântico Norte Equatorial. Está localizado a cerca de 1000 km do litoral do Rio Grande do Norte, litoral nordeste do Brasil (00°55' N e 29°20' O), e distam respectivamente 630 km e 720 km de distância, do Arquipélago de Fernando de Noronha e do Atol das Rocas, regiões emersas mais próximas (Campos *et al.*, 2005). É formado por um grupo de dez pequenas ilhas, com uma área total emersa de 7.500 m<sup>2</sup>, das quais, as quatro maiores são Belmonte, São Paulo, São Pedro e Barão de Teffé (Campos *et al.*, 2005).

O ASPSP está localizado entre os hemisférios norte e sul e entre os continentes africano e americano e exerce grande influência no ciclo de vida de diversas espécies migratórias, assumindo uma grande importância como local de reprodução e alimentação (Campos *et al.*, 2005).

As atividades pesqueiras no ASPSP ocorrem desde o final dos anos 50, especialmente por embarcações japonesas, e a partir da década de 70, também por embarcações nacionais voltadas à captura de lagosta e de atuns e afins. Hodiernamente, o ASPSP se estabeleceu como uma relevante área pesqueira da Zona Econômica Exclusiva (ZEE) brasileira (Hazin *et al.*, 2009). Essas atividades ocorrem em uma área que se estende do 50 metros até 10 milhas náuticas de distância do arquipélago, através de espinhel, corrigo e covos (Vaske *et al.*, 2006). Entre as espécies de valor comercial regularmente capturadas nesta região encontra-se o peixe-prego, *Ruvettus pretiosus*, com uma captura estimada de aproximadamente 3000 kg/ano (Viana *et al.*, 2015).

O ASPSP forma um cume rochoso submarino que se eleva de uma profundidade de 4.000 m (Miguens, 2005), com ausência de praias, vegetação e água potável. Consiste em uma formação rochosa submarina que compreende diferentes

níveis de zonação do mar, que se estende desde a zona epipelágica (da superfície a 200 m de profundidade) até a abissopelágica, que se estende dos 3.500 m à 6.500 m de coluna de água. Desse modo, proporciona condições únicas para estudos evolutivos do seu principal componente vertebrado, os peixes.

### 1.1 Zonação dos ambientes oceânicos

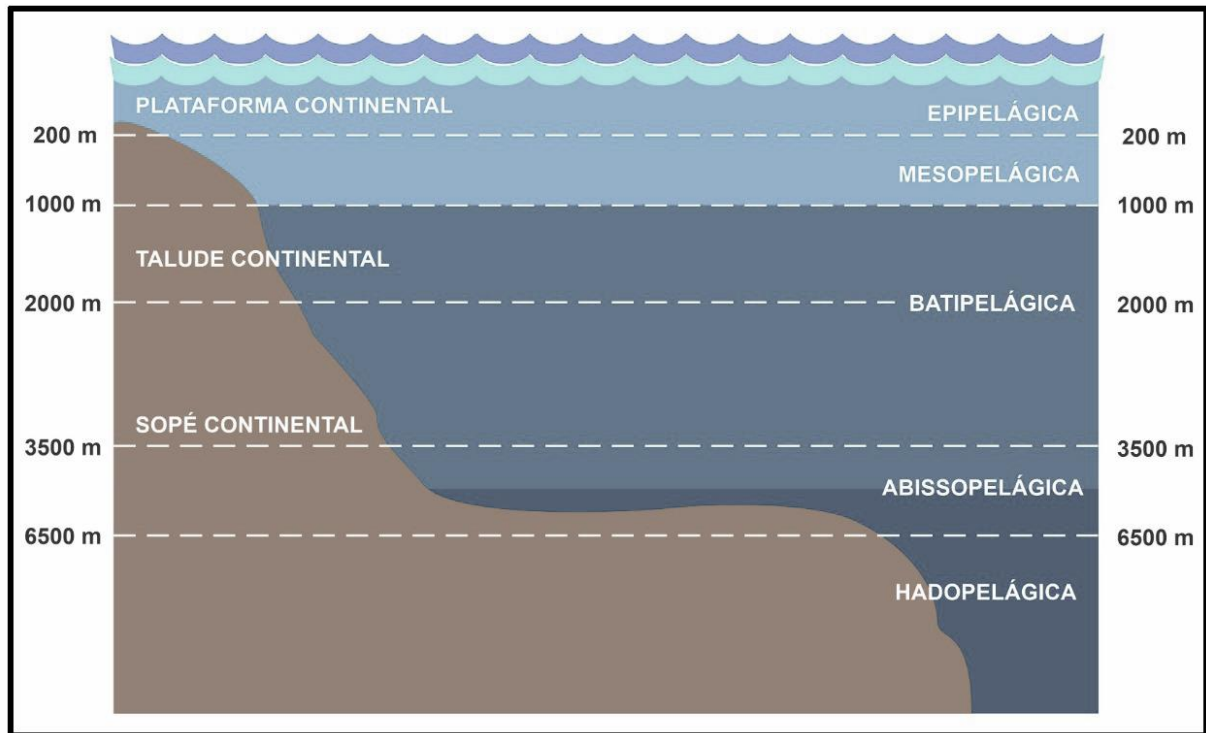
O ambiente oceânico representa o maior ecossistema do planeta, abrangendo cerca de 90% de toda a água existente da superfície da Terra. Este ambiente é formado por toda massa de água da superfície, bem como pelas regiões com profundidades maiores que 200 m. Essa organização, consiste o ambiente marinho, que é dividido verticalmente em dois grandes domínios, o pelágico e o bentônico, além de outras divisões, conforme as variáveis físicas e biológicas de cada secção (Colaço *et al.*, 2017).

Em relação a estas divisões horizontais, classifica-se como Região Nerítica, a faixa que compreende parte da região pelágica que se dispõe da linha da maré alta até o final da plataforma continental e início do talude continental; e a Região Oceânica, que abrange toda a área após a plataforma continental, abaixo dos 200m de profundidade, subdividida verticalmente em três zonas, de acordo com a profundidade (Figura 1) (Colaço *et al.*, 2017).

A primeira é a região Fótica, que abrange toda área oceânica desde à superfície até os 200 m de profundidade, na qual, a luz consegue penetrar o suficiente para que a fotossíntese aconteça. Essa região também é conhecida como Zona Epipelágica (Galand *et al.*, 2010). Em seguida, se situa a região Disfótica, com baixa iluminação, que embora ainda receba alguma luz, esta é insuficiente para que o processo fotossintético possa ocorrer. Essa zona compreende áreas que vão dos 200 aos 1000m de profundidade e é chamada também de zona Mesopelágica (Barange *et al.*, 2010).

A região mais profunda, a Região Afótica, consiste nas camadas mais profundas desse ecossistema, onde a luz solar não tem efeito direto, que é dividida nas zonas Batipelágica, que vai de 1000 à 3500 m de profundidade, Abissopelágica ou Abissal, que pode chegar até 6500 m de profundidade, e na Zona Hadopelágica ou Hadal, que abrange os demais níveis da coluna d'água (Barange *et al.*, 2010; Galand *et al.*, 2010).





**Figura 1.** Representação das zonas oceânicas de acordo com a profundidade.

Desde os 200 m de profundidade, onde inicia-se a zona mesopelágica, se estendendo até aos 1000 m de profundidade, mesmo havendo penetração de luz, esta já não é suficiente para a realização de fotossíntese, interferindo na produção primária da maioria dos ambientes de mar profundo (Ramirez-Llodra *et al.*, 2011). Na falta do fitoplâncton, a oferta de alimento é limitada aos detritos ou à predação, o que explica a atividade migratória entre os indivíduos da zona mesopelágica para a epipelágica (Colaço *et al.*, 2017).

Apesar de boa parte dos organismos existentes na zona mesopelágica não diferir da anterior, existem importantes alterações adaptativas, tanto morfológicas quanto fisiológicas, como a presença de órgãos luminosos, coloração negra ou prateada, resultado de uma eficiente camuflagem na zona disfótica. Além disso, a maior parte dos peixes possuem olhos tubulares, bem como a boca direcionada para cima (Colaço *et al.*, 2017).

Nos ambientes insulares, além dos aspectos físicos e evolutivos, o isolamento geográfico os tornam importantes modelos para a pesquisa biológica, incluindo abordagens evolutivas, biogeográficas, ecológicas e conservação (Viana *et al.*, 2012; Luz e Coimbra, 2014).

## 1.2 Aspectos biológicos da família Gempylidae

Vários grupos de peixes apresentam notável diversificação e especializações aos ambientes pelágicos ou profundos (Nelson *et al.*, 2016). As espécies da ordem Scombriformes em grande parte habitam águas pelágicas e/ou de profundidade. Esse grupo compreende as subordens Scombroidei e Stromateoidei, com 16 famílias, 57 gêneros e pelos menos 284 espécies (Nelson *et al.*, 2016; Eschmeyer e Fong, 2020).

Scombroidei é constituída pelas famílias Gempylidae, Trichiuridae e Scombridae, que juntas corresponde a 41 gêneros e pelo menos 125 espécies. Em geral, partilham mandíbula superior não protusivo (pré-maxila fixa) e dentes anquilosados. Inclui espécies que estão entre os mais rápidos nadadores do mundo, como o importante grupo dos atuns (Nelson *et al.*, 2016). A família Gempylidae se apresenta como um dos ramos menos conhecidos neste grupo, formada por 16 gêneros e 27 espécies de peixes mesopelágicos e bento-pelágicos (Nelson *et al.*, 2016; Eschmeyer e Fong, 2020). É predominantemente formada por predadores grandes e rápidos, em geral atingindo mais de 1 m de comprimento, habitando todos os oceanos, em profundidades que variam de 200 a 500 m (Nakamura e Parin, 1993).

Morfologicamente, os gempylídeos possuem um corpo alongado e comprimido; maxilar inferior saliente; dentes muito longos; maxila exposta; pequenas nadadeiras não retráteis sem raios isoladas, geralmente encontrados por trás das nadadeiras dorsais e anais; nadadeira anal com um a três espinhos e 8-35 raios moles; nadadeira caudal presente; nadadeira peitoral em posição inferior no corpo; nadadeira pélvica com um espinho e cinco raios moles ou reduzido a um único espinho; vértebras variando de 32-58 (Nelson *et al.*, 2016).

Algumas espécies têm larga ocorrência no Atlântico, como o peixe-prego, *Ruvettus pretiosus* (Cocco, 1829), espécie bentopelágica oceânica que ocorre em águas tropicais, subtropicais e temperadas de todos os oceanos, incluindo o mar Mediterrâneo. Encontrada em profundidades de 100 à 1.500 m (Nakamura e Parin, 1993), atinge até três metros de comprimento, e alto valor comercial, devido ao emprego na alimentação (Viana *et al.*, 2012).

Outra espécie da família presente no ASPSP, *Promethichthys prometheus* (Cuvier, 1832), possui distribuição em águas temperadas tropicais e mornas, em profundidades que podem variar de 100 e 800 m de profundidade (Schneider, 1990;

Lorenzo e Pajuelo, 1999). Durante o dia se mantêm em águas profundas, migrando à noite para águas mais rasas em busca de alimento, principalmente constituído por crustáceos, cefalópodes e teleósteos planctônicos (Nakamura e Parin, 1993).

Além de *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*, as águas profundas no entorno do ASPSP, ainda abrigam apenas mais uma espécie de Gempylidae, a espécie monotípica, *Gempylus serpens* (Cuvier, 1829), que se distribui até 600 m de profundidade (Oliveira *et al.*, 1997; Feitoza *et al.*, 2003; Vaske Jr. *et al.*, 2006, 2008).

### 1.3 Aspectos sistemáticos e diversidade da família Balistidae

Contrastando com grupos menos diversificados, a ordem Tetraodontiformes, cujos representantes são conhecidos como baiacus, peixes-porcos, peixes-cofres ou cangulos, apresentam características citogenéticas e morfológicas muito diversificadas (Sá-Gabriel e Molina, 2005; Martinez *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2016). Esta ordem é composta por 106 gêneros e 439 espécies, distribuídas em dez famílias (Triacanthodidae, Triacanthidae, Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Triodontidae, Tetraodontidae, Diodontidae, Molidae e Aracanidae), distribuídas circuntropicalmente em ambientes continentais tropicais e temperados e em vastas regiões marinhas (Nelson *et al.*, 2016; Eschmeyer e Fong, 2020).

A biologia evolutiva de Tetraodontiformes é diversificada, como quanto ao tamanho corporal, com espécies com poucas gramas, como o baiacu, *Carinotetraodon travancoricus*, até o peixe-lua, *Mola mola*, maior peixe ósseo conhecido, que pode atingir 2000 kg (Matsuura, 2014; Nelson *et al.*, 2016).

A maior parte das famílias de Tetraodontiformes apresenta menos de 25 espécies. Três famílias apenas possuem números mais elevados de espécies, que são Tetraodontidae (192 espécies), Monacanthidae (111 espécies) e Balistidae (42 espécies) (Eschmeyer e Fong, 2020).

Conhecidos como cangulos, ou peixes-porcos, os integrantes da família Balistidae ocupam ambientes marinhos dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. A família é composta por 12 gêneros e pelo menos 42 espécies (Nelson *et al.*, 2016; Eschmeyer e Fong, 2020). Em geral, suas espécies possuem cores vivas, habitam áreas recifais e possuem hábitos diurnos. Sua principal característica morfológica é a presença de três espinhos dorsais, no qual o primeiro é mais desenvolvido que os demais (Chen *et al.*, 2001).

Entre os representantes da família Balistidae que habitam águas mais profundas, estão incluídos os representantes do gênero *Canthidermis*, formado por apenas três espécies, *Canthidermis maculata* (Bloch, 1786), *Canthidermis sufflamen* (Mitchill, 1815) e *Canthidermis macrolepis* (Boulenger, 1888) (Clark *et al.*, 2015). Essas espécies são morfologicamente semelhantes, podendo ser confundidas em fases ontogenéticas precoces, mas apresentam distribuições geográficas variadas. Assim, *C. maculata* apresenta uma distribuição circuntropical, embora não relatada para o Mar Mediterrâneo; *C. sufflamen*, habita áreas do Atlântico e Caribe, enquanto *C. macrolepis* se distribui pelo Mar Vermelho, Golfo de Omã e Oceano Índico ocidental (Clark *et al.*, 2015).

Em várias regiões oceânicas, como na costa da Venezuela, em função da abundância e fonte proteica de baixo custo, as espécies de Balistidae são importantes alvos da pesca comercial e de subsistência (Alarcón *et al.* 2017). Apesar do aumento do consumo, os cangulos são regularmente descartados como pesca acessória (Matos-Caraballo *et al.*, 2007; Gastauer *et al.*, 2017). O emprego na alimentação e mercado de peixes ornamentais (Ray e Mohapatra, 2020), justifica a ampliação de informações sobre a taxonomia, distribuição e características biológicas dessas espécies, com vistas a estratégias para conservação da biodiversidade.

#### 1.4 A citogenética como ferramenta para estudos evolutivos

A citogenética se relaciona ao estudo dos cromossomos, tanto em seus aspectos morfológicos e funcionais, quanto sua variação e evolução (Molina e Jacobina, 2013). Essa abordagem é eficiente na caracterização de grupos naturais, utilizando dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) (Dias e Giuliano-Caetano, 2002) e na elaboração de padrões de relacionamento e ou filogenias (citossistemática) (Molina e Jacobina, 2013).

A extensão do uso da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) tem indicado as sequências de DNAs repetidos como uma importante ferramenta para estudos evolutivos em peixes (Costa *et al.*, 2013). Marcadores de DNAs repetitivos, vêm sendo utilizados também de forma aplicada na aquicultura, visando o melhoramento genético de características como aumento do crescimento, resistência a doenças, variabilidade genética das populações entre outras (Beardmore *et al.*, 2001; Jankun *et al.*, 2007; Ferreira e Martins, 2008; Oleksiak, 2010).

Esses tipos de análises têm gradualmente constituído importante ferramenta complementar na elucidação do status taxonômico de peixes marinhos, auxiliando na distinção de espécies crípticas, assim como em inferências filogenéticas, reavaliando espécies anteriormente descritas (Byrkjedal *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2010; Baldwin *et al.*, 2011; Trivedi *et al.*, 2015; Uiblein e Gouws, 2015).

Os dados citogenéticos para espécies de peixes têm se ampliado significativamente. Até 1996, menos de 2% das espécies de peixes marinhos haviam sido descritas (Brum, 1996), passados alguns anos esse conhecimento passou a abranger 12,2% das espécies de peixes (Arai, 2011), o que no entanto ainda é um percentual muito pequeno frente a diversidade biológica do grupo. O mais recente levantamento citogenético em peixes listou informações cromossômicas disponíveis para 3.425 espécies e subespécies (Arai, 2011). Desde então, o número de dados citogenéticos para o grupo tem sofrido considerável incremento. Nesse contexto, a citogenética tem auxiliado a taxonomia, haja visto a utilização exclusiva de caracteres morfológicos é mais vulnerável às variações geográficas ou ambientais (Bertollo *et al.*, 1978), e adicionalmente tem proporcionado subsídios para a melhor compreensão das relações evolutivas entre populações e espécies (Molina e Jacobina, 2013).

Do conjunto de dados citogenéticos disponível decorrem exemplos de grande conservadorismo cariotípico em alguns grupos no ambiente marinho (Molina, 2007; Motta-Neto *et al.*, 2019). Por outro lado, outros grupos apresentam notáveis variações cariotípicas e numéricas, que incluem mudanças no número de cromossomos, que atinge  $2n=264$  no esturjão chinês, *Acipenser sinensis* (Zhou *et al.*, 2008),  $2n=48$ , compartilhado por muitas espécies das famílias de Perciformes (Motta-Neto *et al.*, 2011), até valores diploides reduzidos, como  $2n=12$ , em *Gonostoma bathyphylum* (Post, 1974).

Há cerca de duas décadas, iniciaram-se as primeiras análises citogenéticas em espécies com ocorrência em ambientes insulares do Atlântico (Molina e Galetti, 2004; Molina, 2007), entre os quais o ASPSP. Apesar dos desafios de natureza logística, o conhecimento sobre os aspectos citogenéticos dos peixes recifais e pelágicos do ASPSP têm aumentado significativamente (e.g. Lima-Filho *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2016), envolvendo informações de mais de 25 espécies (Tabela 1) (Molina *et al.*, 2018).

**Tabela 1.** Dados citogenéticos de espécies de peixes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

<b>Espécies</b>	<b>2n</b>	<b>Cariótipo</b>	<b>NF</b>	<b>Referências</b>
<i>Bodianus insularis</i>	48	4m+12sm+14st+18a	78	Molina <i>et al.</i> , 2012b
<i>Caranx lugubris</i>	48	6sm + 42a	54	Jacobina <i>et al.</i> , 2014
<i>Coryphaena equiselis</i>	48	2m+6sm+40a	56	Soares <i>et al.</i> , 2014
<i>Coryphaena equiselis</i>	47	3m+6sm+38a	56	Soares <i>et al.</i> , 2014
<i>Coryphaena hippurus</i>	48	2m+4sm+42a	54	Soares <i>et al.</i> , 2014
<i>Coryphaena hippurus</i>	47	3m+4sm+40a	54	Soares <i>et al.</i> , 2017
<i>Chromis multilineata</i>	48	48a	48	Cunha <i>et al.</i> , 2014
<i>Halichoeres radiatus</i>	48	48a	48	Amorim <i>et al.</i> , 2017
<i>Ophioblennius trinitatis</i>	46	6m+12st+28a	64	Galvão <i>et al.</i> , 2011
<i>Acanthocybium solandri</i>	48	2st+ 46a	50	Soares <i>et al.</i> , 2013
<i>Thunnus albacares</i>	48	2m+2st+44a	52	Soares <i>et al.</i> , 2013
<i>Thunnus obesus</i>	48	2m+2st+44a	52	Soares <i>et al.</i> , 2013
<i>Melichthys niger</i>	40	40a	40	Lima <i>et al.</i> , 2011
<i>Cantherhines macrocerus</i>	40	40a	40	Lima <i>et al.</i> , 2011
<i>Myripristis jacobus</i>	48	48a	48	Bacurau e Molina, 2004
<i>Gymnothorax miliaris</i>	84	14m+18sm+10st	84	Vasconcelos e Molina, 2009
<i>Enchelycore nigricans</i>	68	6m+8sm+12st+16a	68	Vasconcelos e Molina, 2009
<i>Muraena pavonina</i>	52	6m+4sm+32a	52	Vasconcelos e Molina, 2009
<i>Abudefduf saxatilis</i>	52	2m+2sm+44a	52	Molina, 2007
<i>Stegastes sanctipauli</i>	48	22m+22sm+4a	92	Molina e Galetti, 2004
<i>Chaetodon striatus</i>	48	48a	48	Dados não publicados
<i>Elagatis bipinnulata</i>	48	2st+46a	50	Soares <i>et al.</i> , 2017
<i>Seriola rivoliana</i>	48	2sm+2st+44a	52	Soares <i>et al.</i> , 2017
<i>Holocentrus adscensionis</i>	50	2m+6sm+16st+26a	74	Bacurau e Molina, 2004

Apesar do aporte de novas informações, ainda existem grandes lacunas do conhecimento citogenético sobre espécies pelágicas e de profundidade em ambientes insulares do Atlântico, incluindo a remota região do ASPSP, dentre os quais se incluem as espécies da família Gempylidae e Balistidae (Molina *et al.*, 2018). Dessa forma, caracterizações citogenômicas integradas de grupos que ocupam regiões oceânicas de pouco acesso contribuem para o entendimento do papel das mudanças cromossômicas na evolução da ictiofauna do ASPSP.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar aspectos da evolução cromossômica das famílias Gempylidae e Balistidae, grupos de peixes pelágicos e de profundidade de ocorrência no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, contribuindo para o entendimento dos seus padrões de divergência citogenômica.

### 2.2 Objetivos Específicos

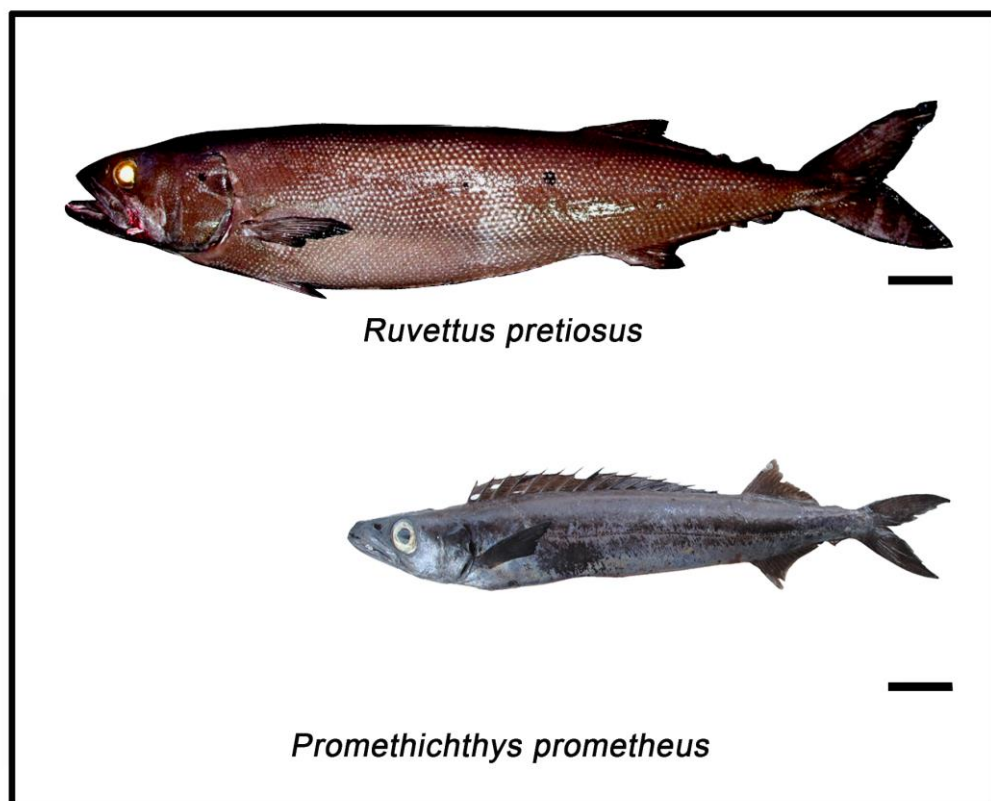
- Caracterizar citogeneticamente as espécies *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus* (Gempylidae) por meio da citogenética convencional e molecular com o emprego da FISH, evidenciando a evolução de sequências de DNA repetitivo nos cromossomos das espécies mencionadas.
- Analisar a evolução de sequências de DNA repetitivo nos cromossomos das espécies *Canthidermis maculata* e *C. sufflamen* (Balistidae), presentes no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, utilizando técnicas de citogenéticas clássicas e hibridização *in situ* com fluorescência, empregando como sondas quatro classes de DNA repetitivo, os DNAs ribossomais 18S e 5S, elementos transponível *Tol2* e retrotransponível *Rex3*, bem como sequências teloméricas.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

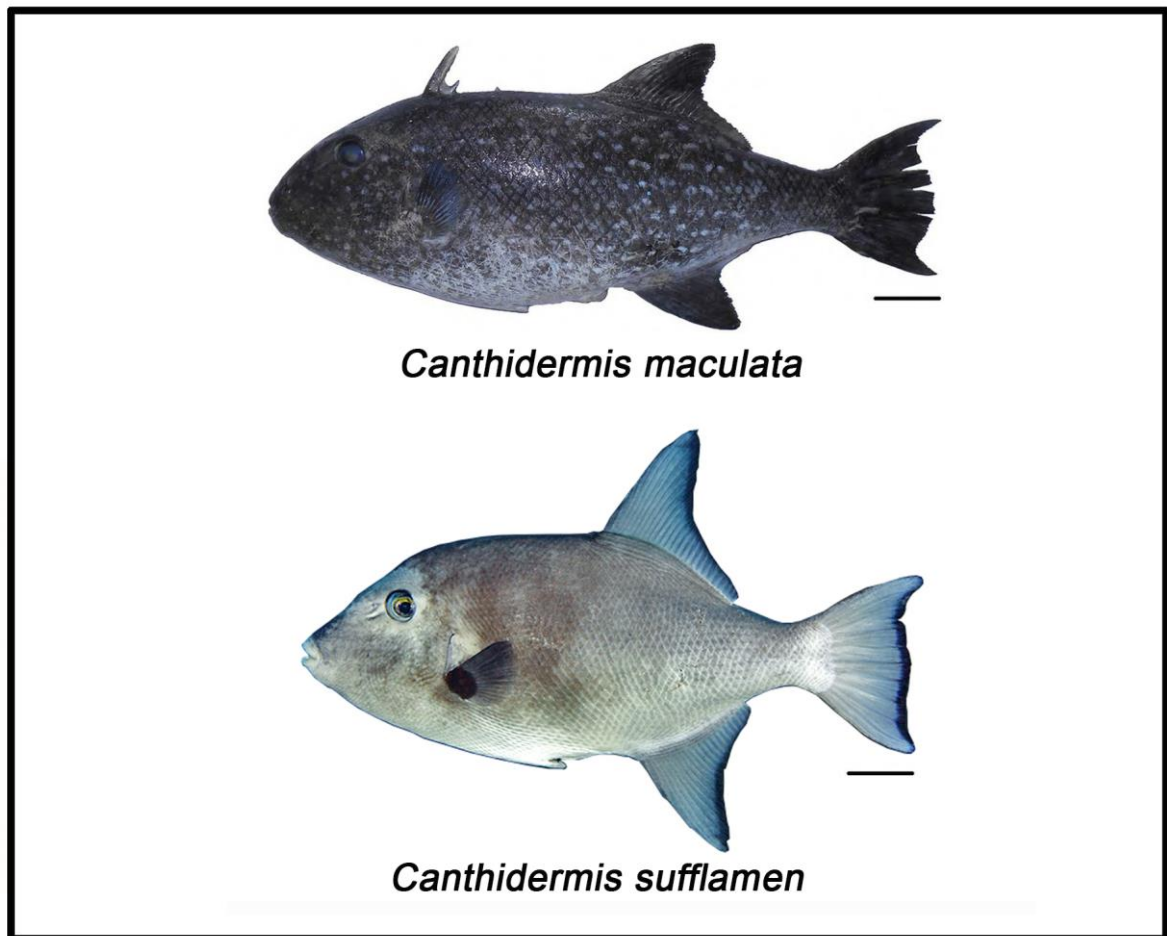
#### 3.1 Material

Foram analisados exemplares da família Gempylidae, sendo 10 espécimes de *Ruvettus pretiosus* (Cocco,1833) e 5 espécimes de *Promethichthys prometheus* (Cuvier, 1832) (Figura 2). Adicionalmente foram analisadas espécies da família Balistidae, consistindo de 13 espécimes de *Canthidermis maculata* (Bloch,1786) e oito de *Canthidermis sufflamen* (Mitchill, 1815) (Figura 3), todos coletados no Arquipelago de São Pedro e São Paulo (00°55'15" N, 029°20'60" O), localizado a 1100 km da costa nordeste do Brasil. Os protocolos de campo e manuseio no laboratório utilizados neste estudo, incluindo a amostragem de espécimes, foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Proc. # 44-15).



**Figura 2.** Espécies da família Gempylidae utilizadas nas análises citogenéticas. Barra = 10 cm.





**Figura 3.** Espécies da família Balistidae utilizadas nas análises citogenéticas. Barra = 4 cm.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Técnica de preparação de cromossomos mitóticos

Para obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizados dois protocolos citogenéticos, dependendo do tamanho e condições dos exemplares. Para exemplares de menor tamanho fragmentos do tecido renal anterior foram removidos e adicionados em meio de cultura RPMI 1640 de acordo com a técnica *in vitro* (Gold *et al.*, 1990). Sucintamente, foram os fragmentos de tecido renal foram dissociados em 9 ml de meio de cultura RPMI 1640, através de aspirações com seringas de vidro de 10 ml, até se obter um mistura homogênea, e em seguida foram adicionados 125 $\mu$ l de colchicina 0,025%, deixando agir por 30 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, o material foi centrifugado por 10 minutos à 800rpm. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante, e adicionado 10ml da solução

hipotônica de KCl a 0,075M em temperatura ambiente, homogeneizada e a suspensão incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o período de incubação, a suspensão celular foi pré-fixada com 0,5ml de fixador (Metanol e Ácido acético (3:1)) recém-preparado e gelado. Após homogeneização a suspensão foi centrifugada por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e acrescido 6ml de fixador previamente preparado, o material foi ressuspendido e centrifugado por 10 minutos, processo de fixação do material foi repetido por mais 2 vezes, em seguida foi retirada uma alíquota da suspensão celular e estocada à -20°C em microtubo do tipo Eppendorf de 2ml.

A segunda metodologia de obtenção de material mitótico foi utilizada para exemplares de grande porte através de cultivo de linfócitos (Moorhead *et al.*, 1960). Para tanto, foram coletados 2 ml de sangue total por punção cardíaca, com uma seringa estéril heparinizada, dos quais 0,5ml de sangue total foi adicionado em frascos estéreis de 5ml com meio de cultura RPMI 1640 com soro fetal bovino e fitohemaglutinina. A cultura foi mantida à 27°C por 72 horas. Passado este tempo, foram adicionadas 75µl de colchicina 0,025%, deixando agir por 30 minutos, posteriormente foi centrifugada por 10 minutos à 800rpm. Decorrido o período, foi descartado o sobrenadante, e adicionado 8ml de KCl a 0,075 M e reservado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo, foi realizado a fixação do material e o armazenamento como descrito no método anterior.

As preparações de cromossomos mitóticos, a partir de suspensões celulares, foram realizadas em condições de campo, nas dependências do Laboratório da Estação Científica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, próximo às áreas de captura, enquanto as análises citogenéticas foram realizadas nas instalações físicas do Laboratório de Genética de Recursos Marinhos (LGRM), no Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

### **3.2.2 Preparação das lâminas**

Para análises da morfologia cromossômica e valor diploide das espécies, um volume de 75 µl a 100 µl da suspensão celular foi gotejado em lâmina recoberta com uma fina película de água destilada aquecida à 60°C e posta para secar ao ar em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi corado em uma solução de

Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8, perfazendo uma concentração de 5%, durante 8 minutos, sendo posteriormente lavado com água destilada e seco ao ar.

### 3.2.3 Análises cromossômicas

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico Olympus™ BX41 e fotografadas sob aumento de 1000X através de sistema digital de captura Olympus DP70, utilizando o software DPController 1.2.1.108 (Olympus Optical Co. Ltd.). Foram analisadas cerca de 30 metáfases, na qual, as melhores foram selecionadas para montagem do cariótipo com base na nomenclatura indicada por Levan *et al.* (1964), que levava em consideração a posição dos centrômeros, definindo-os em metacêntricos (m), com a razão entre os braços cromossômicos (RB) variando de 1,00 a 1,70; submetacêntricos (sm), RB=1,71-3,00; subtelocêntricos (st), RN=3,01-7,00; e acrocêntricos (a), RB>7,01.

### 3.2.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs)

A detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foi realizada pela técnica de impregnação por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), de acordo com Howell e Black (1980). Previamente foi preparada uma solução gelatinosa contendo 1g de gelatina incolor dissolvida em 50ml de água destilada e 0,5ml de ácido fórmico. Posteriormente foi depositada sobre uma lâmina com suspensão celular 150 $\mu\text{l}$  de solução de gelatina, 75 $\mu\text{l}$  de água destilada e 175 $\mu\text{l}$  de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  à 50%, misturando bem e recobrimo com uma lamínula. A lâmina foi incubada em estufa à 60°C, até que assumisse uma tonalidade âmbar, aproximadamente 8 minutos, sendo em seguida lavada em água deionizada e seca ao ar. A preparações foram analisadas em microscópio sob aumento de 1000x, e as melhores metáfases fotografadas.

### 3.2.5 Detecção de heterocromatina constitutiva

As regiões heterocromáticas foram identificadas através de bandamento C, de acordo com Sumner (1972). Lâminas com preparações cromossômicas foram mantidas em estufa à 37°C por pelo menos 3 dias. Passado esse período, as lâminas foram imersas em HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 15 minutos, lavadas em água destilada e secas. Em seguida foram mergulhadas em solução saturada de hidróxido de bário [ $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ] 5%, à 42°C, por aproximadamente 1 minuto e 20

segundos, mergulhada rapidamente em solução de HCl 0,2N para interromper a ação do hidróxido de bário, lavadas em água destilada e secas. Após as lâminas serem secas, foram então incubadas em solução salina 2xSSC à 60°C, durante 30 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. Por fim, foram coradas em solução de Giemsa 5% diluída em tampão fosfato (pH=6,8), durante 4 minutos.

### **3.2.6 Coloração com fluorocromos base-específicos**

A coloração com fluorocromos base-específicos foi utilizada para detectar características da composição das regiões cromossômicas. A coloração com Cromomicina (CMA<sub>3</sub>) foi empregada para evidenciar regiões ricas em bases GC e 4',6- diamidino-2-fenilindol (DAPI), as regiões ricas em bases AT, de acordo com Schweizer (1976). Para a detecção das regiões GC ricas, as lâminas com suspensão celular foram coradas com 30µl de CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/ml), cobertas com lamínulas e depositadas em câmara úmida, no escuro, sendo lavadas com água destilada após 2 horas. As regiões AT ricas, foram identificadas utilizando 30µl de DAPI (2µl/ml), coberta por lamínula e colocada em câmara úmida, no escuro, por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada e montadas com tampão McIlvaine (pH=7,0) com glicerol (1:1), coberto com lamínula e selado com esmalte incolor. As lâminas foram portanto guardadas em câmara escura em temperatura ambiente e analisadas após 3 dias com fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus™ BX51) com filtros apropriados, em aumento de 1000x. As preparações foram capturadas pelo sistema digital Olympus DP73 com uso do software cellSens (Olympus Optical Co. Ltda.).

### **3.2.7 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**

#### **3.2.7.1 Obtenção de sondas para hibridização**

As sondas de DNAr 5S (200pb) e 18S (1400pb) utilizadas nas análises em Gempylidae e Balistidae, foram obtidas por PCR a partir do DNA genômico de *Rachycentron canadum*. As sondas de *Tol2* e *Rex3* foram obtidas a partir do DNA nuclear de *P. prometheus* e *C. maculata* representantes das famílias Gempylidae e Balistidae, respectivamente. As sondas e os respectivos primers utilizados nos procedimentos de hibridização estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sondas e primers utilizados nas análises por hibridização *in situ* nas espécies das famílias Gempylidae e Balistidae.

Sondas	Primers	Referências
<b>DNAr 5S</b>	A 5' – TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC – 3' B 5' – CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC – 3'	Pendás <i>et al.</i> (1994)
<b>DNAr 18S</b>	NS1 5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C- 3' NS8 5' TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA – 3'	White <i>et al.</i> (1990)
<b>Tol2</b>	4 F 5' - ATA GCT GAA GCT GCT CTG ATC – 3' 4 R 5' – CTC AAT ATG CTT CCT TAG G – 3'	Kawakami e Shima (1999)
<b>Rex3</b>	F 5' - CGG TGA TAA AGG GCA GCC GTC - 3' R 5' - TGG CAG ACN GTG GTG GTG -3'	Volff <i>et al.</i> (1999) Volff <i>et al.</i> (2000)

### 3.2.7.2 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) seguiu o protocolo de Pinkel *et al.* (1986). As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram lavadas com tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente, sob agitação e, posteriormente, desidratadas em série alcoólica, com etanol à 70%, 85% e 100%. Em seguida, adicionado RNase (0,4%/2XSSC) por 1h em câmara úmida à 37°C. Em seguida, foram tratadas com soluções salinas e pepsina (0,005% em 10mM HCl) à 37°C por 10 minutos e fixadas com formaldeído à 1% por 10 minutos. Após este período o material foi rehidratado em série alcoólica (70%/85%/100%) por 5 minutos em cada banho.

As lâminas preparadas com cromossomos metafásicos foram incubadas em 70% formamida/2xSSC à 72°C, durante 5 minutos, para a desnaturação cromossômica, seguidas de um novo processo de desidratação. A solução de hibridização (50% de formamida, 2xSSC e 10% de sulfato de dextrano) e a sonda desnaturada (5µl), com volume final de 60µl, foram depositados em lâminas e a hibridização realizada durante 16 horas à 37°C em câmara úmida. Lavagens pós-hibridização foram realizadas com formamida 15%/0,2x SSC à 42°C, por 10 minutos, seguido por três lavagens em 0,1xSSC à 60°C por 5 minutos e em Tween 20 (0,05%/2xSSC) por 5 minutos, sob agitação em temperatura ambiente. Foi realizada a incubação em 100ml de NFDM 5% (leite em pó desnatado)/4XSSC, por 15 minutos

à temperatura ambiente, em seguida foram realizadas duas lavagens de 5 minutos em Tween 20.

Os sinais de hibridização das sondas DNAr 18S, *Rex3* e *Tol2* foram detectados utilizando anti-digoxigenina conjugada com rodamina; e para DNAr 5S, utilizando streptavidina conjugada com FITC (Vector, Burlingame, CA, USA). Os oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites d(CA)<sub>15</sub> e d(GA)<sub>15</sub>, foram utilizados como sondas segundo Kubat *et al.* (2008), as sequências foram marcadas diretamente com Alexa-Fluor 555, na extremidade 5', durante a síntese (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SP, Brasil). Os cromossomos foram contracorados com Vectashield/DAPI (1,5µg/ml) (Vector, Burlingame, CA, USA), e posteriormente, visualizados no microscópio.

A hibridação com sondas teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> foi realizada usando o kit Telomere PNA FISH (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), de acordo com as instruções do fabricante.

## CAPÍTULO 1

---

### **Caracterização citogenética de duas espécies da família Gempylidae (*Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*) do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região meso-Atlântica**

#### **RESUMO**

A determinação de padrões cromossômicos é uma condição valiosa em pesquisas genômicas comparativas e têm se mostrado eficiente no entendimento da evolução e organização genômica em peixes marinhos. A ampliação de dados citogenéticos em espécies do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) tem crescido, abrangendo vários grupos taxonômicos e abordagens, incluindo a caracterização, variação populacional e análises de macro-tendências evolutivas do cariótipo. Mesmo com o incremento de informações citogenéticas, alguns grupos, como a família Gempylidae ainda estão negligenciados. Assim, aqui foram realizadas análises citogenômicas nas espécies *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*, provenientes desta remota região oceânica. As análises citogenéticas convencionais, através da coloração com Giemsa, técnica de Ag-RONs e bandamento-C, foram acrescidas com coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI), bem com técnicas citogenômicas através do mapeamento de sequências repetitivas DNAr 18S, DNAr 5S, sequências microssatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>, transposon *Tol2* e retrotransposon *Rex3*, através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH). *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus* têm 2n=48 cromossomos, no entanto, se diferenciam consideravelmente quanto à fórmula cariotípica (NF=50 e NF=84). Em ambas as espécies, sítios DNAr 18S/Ag-RONs estão localizados em mesma posição em um par de cromossomos, aparentemente homeólogo. Os elementos *Tol2* e *Rex3* se mostraram dispersos ao longo dos cromossomos, enquanto as repetições (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub> se localizam nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos. Os resultados são indicativos de marcante diversificação macroestrutural dos cariótipos, mediada por eventos de inversões pericêntricas. Dados adicionais de outras espécies contribuirão para uma melhor compreensão dos padrões evolutivos cromossômicos do grupo.

**Palavras-chave:** Evolução cariotípica, DNAr, DNA repetitivo, retrotransposon, transposon.



## ABSTRACT

Chromosomal patterns is a valuable condition in comparative genomic research and useful to comprehension of the evolution and genomic organization in marine fish. The expansion of cytogenetic data in species from the São Pedro and São Paulo Archipelago (SPSPA) encompassing varied taxonomic groups and approaches, including karyotype characterization, populational variation and macro analyses of the evolutionary trends of the karyotype. Despite the increase in cytogenetic information, some groups, like the Gempylidae family are still neglected. Thus, here were performed cytogenomic analyses in *Ruvettus pretiosus* and *Promethichthys prometheus*, from this remote oceanic region. Conventional cytogenetic analyzes, through Giemsa staining, Ag-NOR technique and C-banding, staining with base-specific fluorochromes (CMA<sub>3</sub>/DAPI), associated with mapping of repetitive sequences 18S rDNA, 5S rDNA, microsatellite sequences (CA)<sub>15</sub> and (GA)<sub>15</sub>, mobile elements *Tol2* and *Rex3*, through fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Ruvettus pretiosus* and *P. prometheus* have 2n = 48 chromosomes, however, they differ considerably regarding the karyotype formula (NF = 50 and NF = 84). In both species, 18S rDNA/Ag-NOR sites were located in the same position on a pair of chromosomes, apparently a homeologs. The elements *Tol2* and *Rex3* shown dispersed along the chromosomes, while the repetitions (GA)<sub>15</sub> and (CA)<sub>15</sub> occurred in the centromeric and terminal regions of the chromosomes. These results are indicative of marked macro-structural cytogenetic diversification, mediated by events of pericentric inversions. Additional data from other species will contribute to a better understanding of the chromosomal evolutionary patterns of the group.

**Keywords:** rDNA, repetitive DNA, retrotransposon, transposons.

## INTRODUÇÃO

A família Gempylidae é constituída por predadores meso- e bento-pelágicos, em geral de grande porte (> 1 m), com distribuição circunglobal, habitando normalmente profundidades entre 200 a 500 m (Nakamura e Parin, 1993).

Esta pequena família está incluída na ordem Scombriformes, compreendendo 16 gêneros e 27 espécies (Eschmeyer e Fong, 2020). Um número reduzido de espécies de Gempylidae (n=3) ocorre no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), um ponto geograficamente remoto na região meso-Atlântica.

Aspectos citogenéticos de espécies de peixes do ASPSP abrangem uma considerável parcela de sua diversidade íctica, localizada em profundidades de até 50 m, mas pouco representativa para espécies de regiões profundas, que nesta região oceânica podem atingir até 4.000 m (Miguens, 2005). As tendências da evolução



cariotípica em espécies de zonas profundas do ASPSP, incluindo variações macro e microestruturais dos cromossomos, podem prover informações sobre a diversificação nestes ambientes particulares.

Nos eucariotos, cerca de 20 a 90% do genoma é composto por sequências repetitivas (Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011; Mehrotra e Goyal, 2014). DNAs repetitivos contribuem no tamanho, composição e evolução dos genomas (Deng *et al.*, 2019) e sua elevada dinâmica (Mehrotra e Goyal, 2014; Garrido-Ramos, 2015) permite comparações dentro e entre linhagens. Um número considerável de sequências repetitivas é formado por famílias multigênicas, sequências não transcricionais, dispersas ou não, formadas por transposons e retrotransposons e *in tandem*, composta por satélites, minissatélites e microsatélites (Biscotti *et al.*, 2015). Neste sentido, a caracterização da organização do DNA repetitivo nos cromossomos dos peixes auxilia na compreensão da evolução genômica (Ferreira *et al.*, 2010), em abordagens biogeográficas e populacionais (Cioffi *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2010), processos de especiação e caracterização de diversidade críptica (Cioffi *et al.*, 2018) e em inferências filogenéticas (Teixeira *et al.*, 2009).

Diante de contemplar tendências carioevolutivas em espécies da família Gempylidae, com amplos contextos biogeográficos, que podem atingir distribuições circunglobais, e das especificidades ambientais dos ambientes profundos que habitam foram realizadas análises citogenéticas nas espécies *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*, através de métodos citogenéticos convencionais (coloração de Giemsa, bandamento C e detecção Ag-RONs), coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) e hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), utilizando sondas de DNAr 18S e 5S, repetições microsatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>, e elementos transponíveis *Tol2* e *Rex3*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 10 indivíduos de *Ruvettus pretiosus* (Cocco, 1833) e 5 indivíduos de *Promethichthys prometheus* (Cuvier, 1832), provenientes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (00°55'15" N, 029°20'60" O) (Figura 4).

A obtenção de cromossomos mitóticos ocorreu através da cultura *in vitro* de curto termo de fragmentos do tecido renal anterior (Gold *et al.*, 1990) e pelo cultivo de

linfócitos (Moorhead *et al.*, 1960), em meio de cultura RPMI 1640, com soro fetal bovino e fitohemaglutinina.

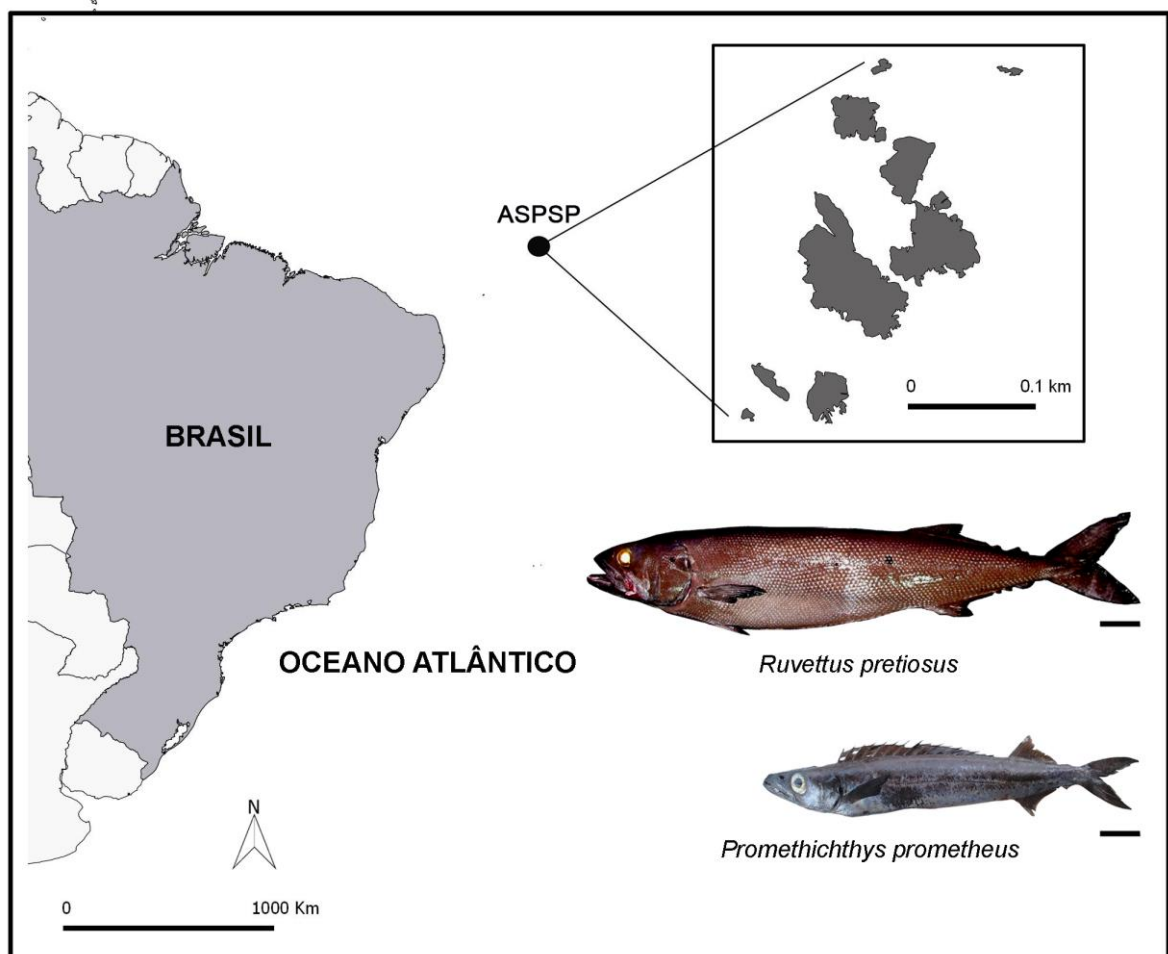
As suspensões celulares foram gotejadas sobre a lâmina recoberta com uma película de filme de água aquecida a 60°C, após secas, a lâmina foi corada com uma solução de Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8, perfazendo uma concentração de 5%. Posteriormente, foi analisada em microscópio, fotografada as melhores metáfases para elaboração do cariótipo. As regiões organizadoras de nucléolo foram identificadas através da impregnação por prata (Howell e Black, 1980). A detecção de regiões heterocromáticas foi realizada através do bandamento C (Sumner, 1972). Regiões cromossômicas ricas em bases GC e AT, foram determinadas através da coloração com os fluorocromos base-específicos Cromomicina (CMA<sub>3</sub>) e 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Schweizer, 1976).

Hibridizações fluorescentes *in situ* (FISH) foram realizadas de acordo com Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, do transposon *ToI2* e retrotransposon *Rex3*. As sondas de DNAr 5S (200pb) e DNAr 18S (1400pb) foram obtidas a partir do DNA genômico de *Rachycentron canadum* via PCR, usando os primers A 5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3'/ B 5' GAG AGC GCT GGT ATG GCC AGC-3' (Pendás *et al.*, 1994) e NS1 5'-GTA GTA ATA TGC TTG TCT C-3' / NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3' (White *et al.*, 1990), respectivamente.

As sondas *Rex3* e *ToI2* foram obtidas via PCR a partir da amplificação de DNA de *P. prometheus*, respectivamente através dos primers Rex 3 F 5' - CGG TGA TAA AGG GCA GCC GTC - 3' e Rex 3 R 5'- TGG CAG ACN GTG GTG GTG - 3' (Volf *et al.*, 1999; 2000) e 4F 5' - ATA GCT GAA GCT GCT CTG ATC - 3' e 4R 5' - CTC AAT ATG CTT CCT TAG G - 3' (Kawakami e Shima, 1999). Os produtos de amplificação foram marcadas por *nick translation* (Roche, Mannheim, Alemanha), com digoxigenina-11-dUTP, seguindo as instruções do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha).

FISH com oligonucleotídeos das sequências microssatélites d(CA)<sub>15</sub> e d(GA)<sub>15</sub>, foi realizado segundo Kubat *et al.* (2008). As sequências foram marcadas diretamente com Alexa-Fluor 555, na extremidade 5', durante a síntese (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil). As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus™BX51, acoplado com um sistema de captura digital de imagens Olympus™DP73 com o uso do software cellSens (Olympus Optical Co. Ltda.).

Os cromossomos foram classificados quanto a sua morfologia em metacêntricos (m), com a razão entre os braços cromossômicos (RB) variando de 1,00-1,70; submetacêntricos (sm), RB=1,71-3,00; subtlocêntricos (st), RB= 3,01-7,00; e acrocêntricos (a), RB>7,01 (Levan *et al.*, 1964). Para definição do número fundamental (NF), número de braços cromossômicos, os cromossomos m, sm e st foram considerados com dois braços e os cromossomos acrocêntricos com um único braço.



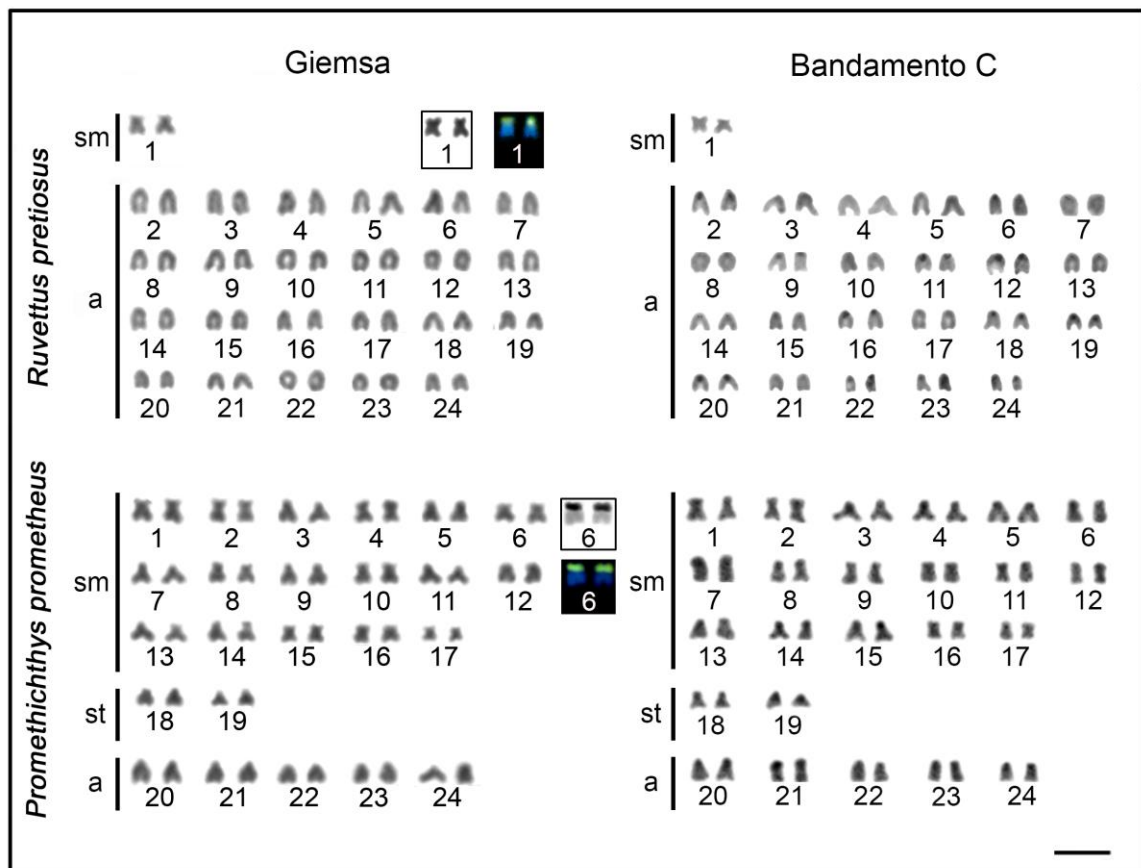
**Figura 4.** Mapa com a posição geográfica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, e indivíduos das espécies *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus* (Gempylidae). Barra = 10 cm.

## RESULTADOS

As espécies *R. pretiosus* e *P. prometheus* têm  $2n=48$  cromossomos, mas divergem consideravelmente quanto as fórmulas cariotípicas. De fato, *Ruvettus pretiosus* apresentou um cariótipo composto por 2 cromossomos submetacêntricos e

46 acrocêntricos (NF=50), enquanto *P. prometheus* revelou elevado número de elementos bibráquias, com o cariótipo formado por 34 cromossomos submetacêntricos, 4 cromossomos subteloacêntricos e 10 cromossomos acrocêntricos (NF=86) (Figura 5). Nestas espécies, a heterocromatina está localizada preferencialmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos.

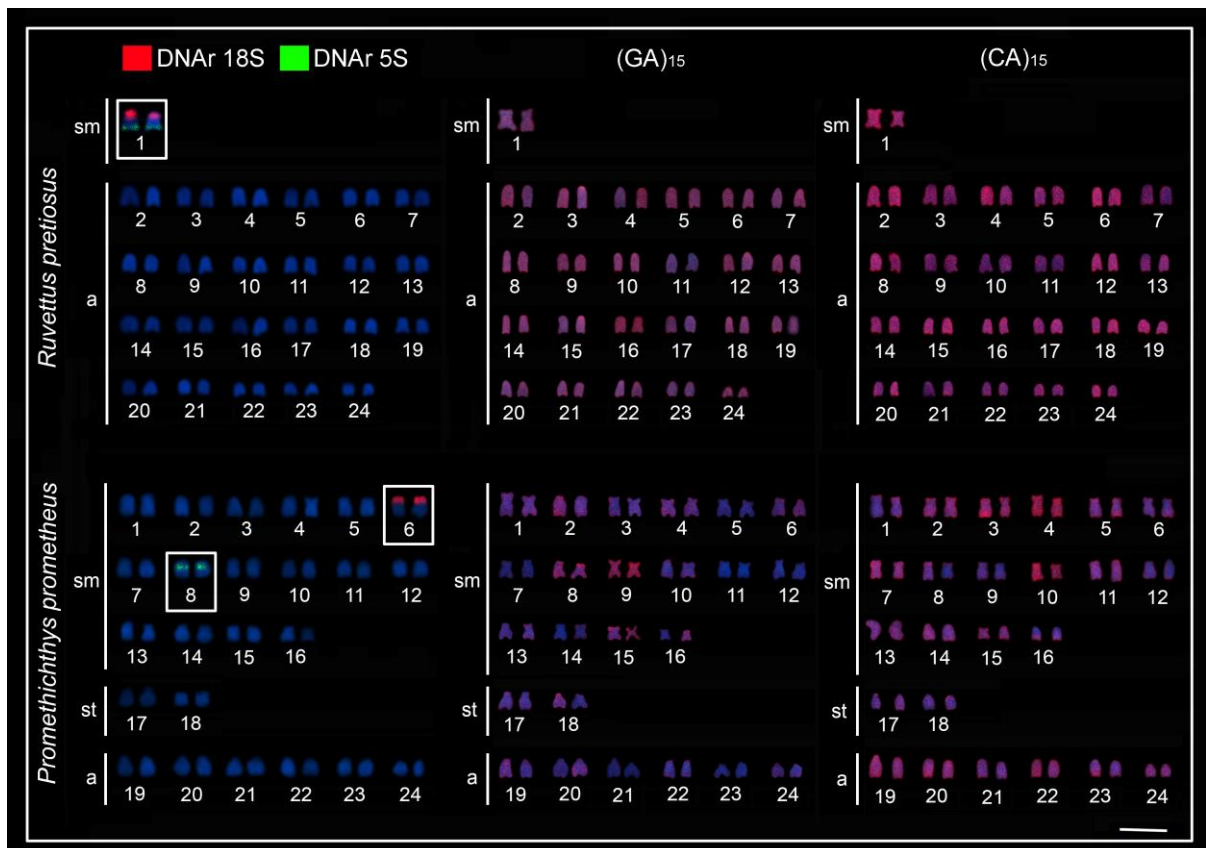
Em *P. prometheus*, os sítios Ag-RONs estão localizados no braço curto do par 6, submetacêntrico. Essas regiões se mostraram heterocromáticas e exibiram um padrão de fluorescência CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Na espécie *R. pretiosus*, os sítios Ag-RONs foram evidenciados nos braços curto do par 1, único par submetacêntrico e, que apresetam um padrão de fluorescência CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Figura 5, em destaque).



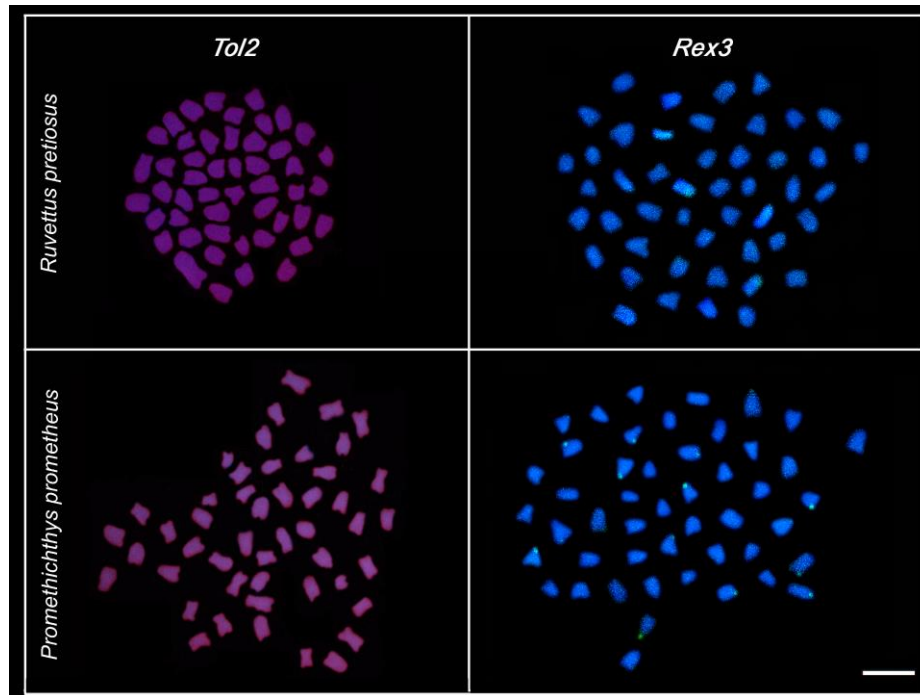
**Figura 5.** Cariótipos de *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*, sob coloração Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas, as regiões CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e os sítios Ag-RONs, respectivamente. Barra = 5µm.

Ambas espécies apresentaram sítios DNAr 18S simples coincidentes com os sítios Ag-RONs. Os sítios DNAr 5S ocorrem em um único par, em posição intersticial dos braços curtos do par 8 em *P. prometheus* e na região terminal dos braços longos

do par 1, em condição sintênica, com os sítios de DNAr 18S, em *R. pretiosus*. As sequências microssatélites (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub> exibiram uma distribuição associada às regiões centroméricas e terminais de alguns pares cromossômicos (Figura 6). As sequências *ToI2* e *Rex3* possuem uma distribuição dispersa ao longo dos cromossomos de ambas as espécies (Figura 7).



**Figura 6.** Hibridização fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e microssatélites (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub>, em *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*. Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 7.** Hibridização *in situ* fluorescente dos elementos *Tol2* e *Rex3* em *Ruvettus pretiosus* e *Promethichthys prometheus*. Barra = 5  $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

Os padrões cariotípicos de *R. pretiosus* e *P. prometheus*, revelam conservadorismo numérico em relação a 15 espécies da família Scombridae (Arai, 2011; Soares *et al.*, 2013), que igualmente apresentam  $2n=48$  cromossomos. Esta condição é considerada basal para Percomorpha (Galetti *et al.*, 2000) e reforça aspectos cariotípicos conservativos na subordem Scombroidei. Por outro lado, as estruturas cariotípicas dessas espécies são conspicuamente distintas (NF=50 e NF=86).

A espécie *Ruvettus pretiosus*, que possui amplo potencial dispersivo e adaptativo revelado por uma distribuição que inclui águas tropicais, subtropicais e temperadas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Nakamura e Parin, 1993), apresenta um cariótipo macroestruturalmente pouco diversificado com um par submetacêntrico e os demais acrocêntricos, constituição cariotípica em geral compartilhada por espécies migradoras da família Scombridae (Soares *et al.*, 2013). Por outro lado, *P. prometheus*, igualmente com distribuição circunglobal onde se distribui por águas tropicais e temperadas mornas de todos os oceanos, com exceção

do Pacífico oriental (Nakamura e Parin, 1993), apresentou uma fórmula cariotípica diferenciada, principalmente modelada por inversões pericêntricas.

Quanto aos aspectos microestruturais dos cromossomos, as espécies exibem algumas sinapomorfias. A presença de sítios Ag-RONs/DNAr 18S únicos situados em mesma posição de cromossomos submetacêntricos de mesmo tamanho, aparentemente homeólogos, sugere algum grau de conservadorismo dos grupos sintênicos neste grupo.

O mapeamento de sequências DNAr 5S revelou um maior nível de variação microestrutural. Em *P. prometheus* estes sítios ocorrem em posição intersticial no braço curto do par 8 (sm), enquanto em *R. pretiosus* se localizam aparentemente em uma organização derivada, na porção terminal do braço longo do par 1, em um arranjo sintênico com os sítios de DNA 18S, que ocupa a porção terminal do braço curto deste par cromossômico.

A independência estrutural dos sítios de DNAr 18S e 5S em *P. prometheus* é condição recorrente em muitos grupos de peixes (Gornung, 2013) e indica uma condição basal. Tem sido sugerido que esse arranjo em posições ou cromossomos diferentes possam ser adaptativos, evitando translocações das sequências do DNAr 5S no DNAr 45S (Dover, 1986). A variação quanto à organização dos sítios DNAr indica diversificação microestrutural envolvendo estas regiões e que mecanismos sequências repetitivas podem ter contribuído para a diversificação cariotípica da família Gempylidae.

Elementos transponíveis se movem no genoma e representam fontes de instabilidade que podem promover variação cariotípica. Nas espécies de Gempylidae os elementos *Tol2* têm uma distribuição homogênea ao longo dos cromossomos das espécies. Da mesma forma, uma organização homogênea dessas sequências ocorre em medaka, onde têm sido largamente analisadas (Koga e Hori, 1999). Em algumas espécies marinhas elementos *Tol2* se associam com sequências repetitivas funcionais, como DNAr 18S, ou diferentes microsatélites, formando complexos conjuntos de DNA repetitivos (Costa *et al.*, 2013; 2014; 2015)

Sequências microsatélites polimórficas dispostas *in tandem* no genoma dos eucariotos e muito variáveis (Tautz, 1989; Zane *et al.*, 2002), possuem taxas evolutivas elevadas e frequentemente apresentam diversificados padrões de acúmulo nos cromossomos dos peixes (Cioffi *et al.*, 2012; Lima-Filho *et al.*, 2014). Entretanto, os microsatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>, em *R. pretiosus* e *P. prometheus*, mostraram-se

dispersos, com reduzido acúmulo em regiões heterocromáticas centroméricas e terminais dos cromossomos, indicando uma dinâmica evolutiva congruente entre as espécies.

A organização citogenômica exibida pelas espécies indica diferenças na macro e microestrutura cromossômica das espécies da família Gempylidae. A diversificação macroestrutural deve-se sobretudo a mecanismos de inversões pericêntricas, enquanto que outros fatores podem comitantemente ter influenciado a ordem sintênica dos grupos de ligação. Este cenário de diversificação intrafamiliar é comum em alguns grupos de peixes recifais, mas até então desconhecida em peixes de regiões profundas. A ampliação de dados citogenéticos para outras famílias de regiões de regiões oceânicas mais profundas contribuirão para uma melhor compreensão dos padrões de evolução cariotípica nestes ambientes.

## REFERÊNCIAS

- Arai, K. (2011). *Fish Karyotypes - A Check List*. New York: Springer.
- Biscotti, M.A., Olmo, E., Heslop-Harrison, J.S. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23: 415–20.
- Cioffi, M.B., Kejnovsky, E., Marquioni, V., Poltronieri, J., Molina, W.F., Diniz, D., Bertollo, L.A.C. (2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular Cytogenetics*, 5: 28.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertollo, L.A.C. (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics*, 10: 1-8.
- Cioffi, M.B., Ráb, P., Sember, A., Molina, W.F., Bertollo, L.A.C. (2018). Conventional Cytogenetic Approaches—Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. *Current Genetic Medicine Reports*, 6: 176-186.
- Costa, G.W.W.F., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2013). Transposable elements in fish chromosomes: A study in the marine Cobia species. *Cytogenetics and Genome Research*, 141: 126-132.
- Costa, G.W.W.F., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2014). Unusual dispersion of histone repeats on the whole chromosomal complement and their colocalization with ribosomal genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). *Cytogenetics and Genome Research*, 144: 1-6.



- Costa, G.W.W.F., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2015). Structurally complex organization of repetitive DNAs in the genome of Cobia (*Rachycentron canadum*). *Zebrafish*, 12: 215-220.
- Deng, H., Xiang, S., Guo, Q., Jin, W., Cai, Z., Liang, G. (2019). Molecular cytogenetic analysis of genome-specific repetitive elements in *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. and its taxonomic implications. *BMC Plant Biology*, 19: 1–1.
- Diniz, D., Laudicina, A., Bertollo, L.A.C. (2009). Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32: 37–4.
- Dover, G.A. (1986). Molecular drive in multigene families: How bi-ological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genetics* 2: 159-165.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R., Van der Laan, R. (2020). Catalog of fishes: genera, species, references. Available in <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. California Academy of Sciences. Electronic version accessed April 02-2020.
- Ferreira, D.C., Oliveira, C., Foresti, F. (2010). Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 64- 70.
- Galetti, P.M.Jr, Aguilar, C.T., Molina, W.F. (2000). An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420: 55–62.
- Galetti, P.M. Jr, Martins, C. (2004). Contributions of in situ hybridization technique to knowledge of the fish chromosomes (in Portuguese). In: Guerra M (ed) FISH: concepts and applications in cytogenetics. SBG, Ribeirão Preto, 61–88.
- Garrido-Ramos, M.A. (2015). Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenetic and Genome Research*, 146: 153–70.
- Gold, J.R., LI, Y.C., Shipley, N.S., Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563–575.
- Hazin, F., Pires, A., Santos, A., Viana, D., Viana, D., Nunes, D., Nunes, I., Coutinho, I., Porto, M., Roque, P., Filho, R., Ferreira, R., Basante, V. (2018). Peixes pelágicos e prospecção em águas profundas no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. *Arquipélago de São Pedro e São Paulo 20 anos de pesquisa*, 128-142.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2011). Organization of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal*, 66:18–33.

- Howell, W.M., Black, D.A. (1980). Controlled Silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kawakami, K., Shima, A. (1999). Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 240: 239–244.
- Khuda-Bukhsh, A.R. Das, J.K. (2007). Cytogenetic analyses in eight species of teleostean fishes (Pisces): karyotypes, multiple AgNORs, sex chromosomes. *Research & Reviews in BioSciences*, 1: 47–52.
- Kidwell, M.G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115: 49-63.
- Koga, A., Hori, H. (1999). Homogeneity in the structure of the medaka fish transposable element *Tol2*. *Genetics Research*, 74: 7–14.
- Koga, A., Hori, H. (2000). Detection of de Novo Insertion of the Medaka Fish Transposable Element *Tol2*. *Genetics Research*, 156: 1243-1247.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220.
- Lima-Filho, P.A., Bertollo, L.A.C., Cioffi, M.B., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2014). Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: Darter and emerald gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenetic and Genetics Research*, 142: 197–203.
- Martins, C., Galetti, P.M.Jr. (1999). Chromosomal localization of 5S rRNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363–367.
- Mehrotra, S. Goyal, V. (2014). Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12:164–71.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellmam, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613-616.
- Miguens, A.P. (1995). Navegação Costeira, Estimada e em Águas Restritas. Volume I. Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha. Rio de Janeiro. 520.
- Nakamura, I., Parin, N.V. (1993). FAO species catalogue. Snake mackerels and cutlassfishes of the world (families Gempylidae and Trichiuridae). *FAO Fisheries Synopsis*, 15: 1-136.

- Pendás, A.M., Morán, P., García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*, 103: 147–152.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2928.
- Schweizer, D. (1976). Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Soares, R.X., Bertollo, L.A.C., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2013). Karyotype stasis in four Atlantic Scombridae fishes: Mapping of classic and dual-color FISH markers on chromosomes. *Fisheries Science*, 79: 177–183.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304–306.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Teixeira, W.G., Ferreira, I.A., Cabral-de-Mello, D.C., Mazzuchelli, J., Valente, G.T., Pinhal, D., Poletto, A.B., Venere, P.C., Martins, C. (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic Genome Research*, 125: 224–234.
- Vicari, M.R., Nogaroto, V., Noletto, R.B., (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76: 1094–1116.
- Volff, J.N., Körting, C., Scharl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673–1684.
- Volff, J.N., Korting, C., Sweeney, K. Charlesworth, Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the Fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., pp. 315–322.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11:1-16.

## CAPÍTULO 2

---

### Similaridades citogenômicas em *Canthidermis maculata* e *C. sufflamen* (Balistidae) e a relação do DNA repetitivo com eventos de redução cariotípica

#### Resumo

A ordem dos Tetraodontiformes apresenta uma considerável diversidade de espécies variadas tendências carioevolutivas. Constitui uma das principais vertentes de irradiação dos teleósteos, caracterizando-se como um grupo eminentemente especializado. Adicionalmente, alguns grupos revelam a menor correlação entre conteúdo de DNA e tamanho celular e importante modelo na evolução genômica em vertebrados. Os aspectos citogenômicos de representantes da família Balistidae no Atlântico, ainda são pouco conhecidos. Desta forma, foram realizadas análises citogenéticas nas espécies *Canthidermis maculata* e *C. sufflamen*, que habitam regiões pelágicas no entorno do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, região meso-Atlântica. As análises citogenéticas incluíram metodologias convencionais (coloração com Giemsa, coloração Ag-RONs e bandamento-C), coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) e sondas de sequências repetitivas DNAr 18S, DNAr 5S, repetições microssatélites [(CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>], elementos transponíveis (*Tol2* e *Rex3*) e sequências teloméricas através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH). *Canthidermis maculata* (4m+8sm+32a; NF=56) e *C. sufflamen* (2m+12sm+30a; NF=58), compartilham um mesmo valor diploide (2n=44), mas diferem na macroestrutura cariotípica. No entanto, compartilham sítios Ag-RONs/DNAr 18S localizados em posição intersticial de um grande par de cromossomos metacêntrico e elementos *Tol2* e *Rex3* e repetições microssatélites (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub> dispersos ao longo dos cromossomos. O reduzido número diploide aparentemente é basal para a família, mas do qual não derivaram sequências teloméricas ectópicas. Balistidae mostra significativas similaridades cariotípicas estruturais e numéricas. Embora a ampliação dos dados citogenéticos seja necessária, a alta vagilidade, proveniente de hábitos pelágicos nas espécies de *Canthidermis* provavelmente interfere para o nível de conservadorismo cariotípico, frente a outras famílias de Tetraodontiformes, com menor capacidade de dispersão no ambiente marinho.

**Palavras-chave:** Carioevolução, FISH, DNA repetitivo, microssatélites, elementos móveis, cangulos.

#### Abstract

The order Tetraodontiformes shows multiple karyoevolutive tendencies. This group is one of the main lineages of irradiation of teleosts, and eminently specialized. Additionally, have the lowest correlation between DNA content and cell size among vertebrates, becoming a significant model in the study of genomic evolution. Cytogenomic aspects of representatives of the Balistidae family in the Atlantic, are still little known. Thus, cytogenetic analyses were performed on the species *Canthidermis*

*maculata* and *C. sufflamen*, from pelagic regions of the Archipelago of São Pedro and São Paulo, meso-Atlantic region. Cytogenetic analyses included conventional methodologies (Giemsa staining, Ag-NOR staining and C-banding), staining with base-specific fluorochromes (CMA<sub>3</sub>/DAPI) and DNAr 18S, DNAr 5S repetitive sequence probes, microsatellite repetitions ((CA)<sub>15</sub> and (GA)<sub>15</sub>), transposable elements (*Tol2* and *Rex3*) and telomeric sequences through fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Canthidermis maculata* (4m + 8sm + 32a; NF = 56) and *C. sufflamen* (2m + 12sm + 30a; NF = 58), share 2n = 44 chromosomes, but differ on the karyotype macrostructure. However, they share Ag-NORs/18S rDNA sites located in the interstitial position of a large pair of metacentric chromosomes and *Tol2* and *Rex3* elements and microsatellite repeats (GA)<sub>15</sub> and (CA)<sub>15</sub> dispersed along the chromosomes. The reduced diploid number is apparently basal for the family, but without evidence of ectopic telomeric sites. Balistidae shows significant structural and numerical karyotype similarities. Although the expansion of cytogenetic data will be necessary, the high vagility, originating from pelagic habits in *Canthidermis* species, probably interferes with the level of karyotype conservatism, compared to other families of Tetraodontiformes, with less dispersion capacity in the marine environment.

**Key words:** Karyoevolution, FISH, repetitive DNA, microsatellites, mobile elements, kangaroos.

## INTRODUÇÃO

Tetraodontiformes se destaca por características genéticas e morfológicas únicas. Seus representantes são conhecidos como baiacus, peixes-porcos, peixes-cofres ou cangulos, e representam um dos principais ramos da diversificação dos teleósteos (Nelson *et al.*, 2016).

Entre as 349 espécies que formam a Ordem Tetraodontiformes (Eschmeyer e Fong, 2020), apenas 15% possui dados cariotípicos conhecidos. Tetraodontidae e Balistidae (Tabela 1) representam os grupos com maior nível de informação citogenética (Arai, 2011).

Nesta Ordem o tamanho do genoma pode variar consideravelmente entre suas famílias (Dolezel *et al.*, 2003), desde genomas reduzidos, com 0,34 pg, em *Sphoeroides spengleri* - Tetraodontidae (Noletto *et al.*, 2009), a genomas maiores com 2,22 pg, como em *Acanthostracion quadricornis* - Ostraciidae (Brainerd *et al.*, 2001). A contração genômica em Tetraodontidae tem sido atribuída à perda de íntrons e de DNA repetitivo (Elgar *et al.*, 1999; Loh *et al.*, 2008), extremamente abundantes em genomas eucarióticos (Biscotti *et al.*, 2015) e representa um processo pouco conhecido na maioria das linhagens de peixes.

A família Balistidae exhibe cariótipos reduzidos, variando de 2n=40-46 (Takai e Ojima, 1987; Sá-Gabriel e Molina, 2005; Arai, 2011), em grande parte modelados por

eventos de fusões cromossômicas (Lima *et al.*, 2011). Análises citogenômicas que ampliem as informações para esta família, sobretudo em gêneros parcamente analisados, auxiliarão na compreensão dos processos mobilizadores das variadas tendências evolutivas presentes em Tetraodontiformes. Assim, aqui foram realizadas análises citogenéticas nas espécies *Canthidermis maculata* e *C. sufflamen*, através de abordagens citogenéticas convencionais (coloração com Giemsa, bandamento C, Ag-RONs), coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI), e mapeamento por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de sequências do DNAr 18S e DNAr 5S, sequências microssatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub>, elementos transponíveis *Tol2* e *Rex3* e sequências (TTAGGG)<sub>n</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realização das análises citogenéticas foram analisados 13 indivíduos de *Canthidermis maculata* (Bloch, 1786) e oito de *C. sufflamen* (Mitchill, 1815) (Balistidae), provenientes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (00°55'15" N, 029°20'60" O), localizado na região Meso-Atlântica, distando 1.100km da costa nordeste brasileira e 1824km da costa africana.

A obtenção dos cromossomos mitóticos ocorreu através da utilização de dois protocolos em relação ao tamanho dos exemplares. Nos exemplares de menor porte foram retirados fragmentos do tecido renal anterior, que foram adicionados a meio de cultura RPMI 1640 seguindo a técnica *in vitro* descrita por Gold *et al.* (1990). Alternativamente, em indivíduos de maior tamanho, os cromossomos mitóticos foram obtidos através do cultivo de linfócitos (Moorhead *et al.*, 1960). Para tanto, foram coletados 2ml de sangue por meio de punção cardíaca, utilizando seringa estéril heparinizada, onde alíquotas foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, com soro fetal bovino e fitohemaglutinina, por 72 horas, à temperatura ambiente. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas em condições de campo, nas instalações do laboratório da Estação Científica do arquipélago de São Pedro e São Paulo.

As suspensões celulares foram gotejadas sobre uma lâmina recoberta com um filme de água aquecida à 60°C. Após seca ao ar, a lâmina foi corada com uma solução de Giemsa diluída em tampão fosfato pH 6,8, perfazendo uma concentração de 5%. Posteriormente, foi analisada em microscópio sob magnificação de 1000X. As

melhores metáfases foram fotografadas e utilizadas na elaboração do cariótipo das espécies. As regiões organizadoras de nucléolo foram identificadas através da impregnação por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Howell e Black, 1980), enquanto as regiões heterocromáticas foram identificadas através do bandamento C (Sumner, 1972). Adicionalmente, os cromossomos foram corados com os fluorocromos base-específicos Cromomicina ( $\text{CMA}_3$ ) e 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Schweizer, 1976).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), utilizando sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, microssatélites  $(\text{CA})_{15}$  e  $(\text{GA})_{15}$ , sequências *To12* e *Rex3*. As sondas de DNAr 5S (200 pb) e DNAr 18S (1400 pb) foram obtidas de amostras de DNA genômico de *Rachycentron canadum*, via PCR, usando os primers A 5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3'/ B 5' GAG AGC GCT GGT ATG GCC AGC-3' (Pendás *et al.*, 1994) e NS1 5'-GTA GTA ATA TGC TTG TCT C-3'/ NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3' (White *et al.*, 1990), respectivamente.

As sondas *Rex3* foram obtidas via PCR a partir da amplificação de DNA de *C. maculata* usando os primers *Rex3* F 5'-CGG TGA TAA AGG GCA GCC GTC - 3' e *Rex3* R 5'- TGG CAG ACN GTG GTG GT-3' G (Volf *et al.*, 1999; 2000). As sondas para amplificação de sequências *To12* foram obtidas através do DNA genômico de *C. maculata* usando os primers 4 F 5' - ATA GCT GAA GCT GCT CTG ATC - 3' e 4 R 5' - CTC AAT ATG CTT CCT TAG G - 3' (Kawakami e Shima, 1999). Os produtos de amplificação foram marcadas por *nick translation* (Roche, Mannheim, Alemanha), com digoxigenina-11-dUTP, seguindo as instruções do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha). Os oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites  $d(\text{CA})_{15}$  e  $d(\text{GA})_{15}$ , foram marcados na extremidade 5', diretamente com Alexa-Fluor 555, durante a síntese (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil) e utilizados como sondas de acordo com Kubat *et al.* (2008). A hibridação com sondas teloméricas  $(\text{T TAGGG})_n$  foi realizada usando o kit Telomere PNA FISH (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), de acordo com as instruções do fabricante.

As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus™BX51, acoplado com a um sistema de captura digital de imagens Olympus™DP73, com o uso do software cellSens (Olympus Optical Co. Ltda.).

Os cromossomos foram classificados quanto a razão entre os braços (RB) como metacêntricos (m), (RB= 1,00-1,70); submetacêntricos (sm) (RB=1,71-3,00); subtelo-cêntricos (st) (RB=3,01-7,00); e acrocêntricos (a) (RB>7,01) (Levan *et al.*,

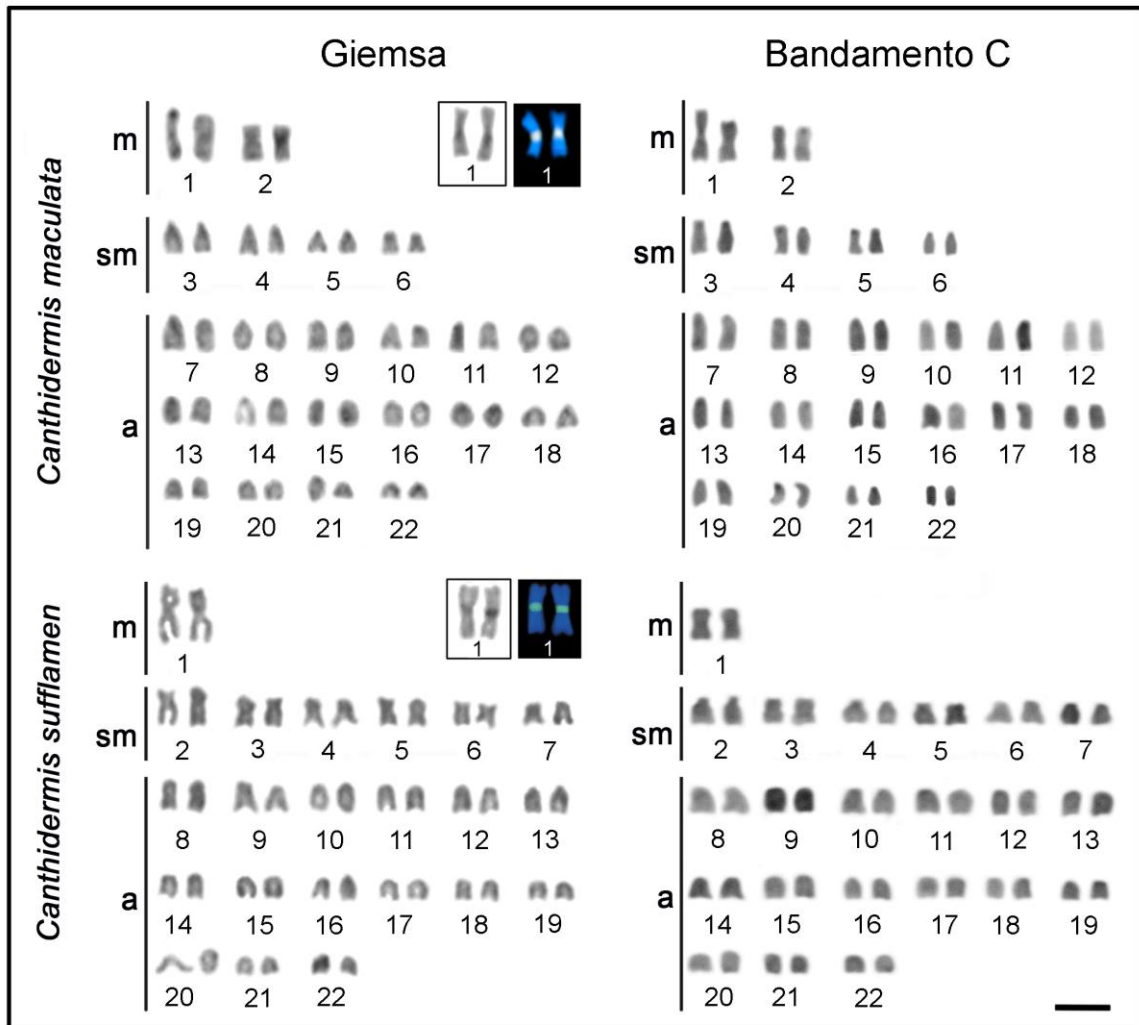
1964). Para o cálculo do número fundamental (NF, número de braços cromossômicos), os cromossomos m, sm e st foram considerados com dois braços e os cromossomos acrocêntricos com um único braço.

## RESULTADOS

As espécies *C. maculata* e *C. sufflamen* apresentaram  $2n=44$ , com algumas divergências em relação às fórmulas cariotípicas. Enquanto, *C. maculata* apresentou 4 cromossomos metacêntricos, 8 cromossomos submetacêntricos e 32 cromossomos acrocêntricos (NF=56), *C. sufflamen* exibiu um cariótipo formado por 2 cromossomos metacêntricos, 12 submetacêntricos e 30 acrocêntricos (NF=58).

Nas duas espécies, as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) se localizou na região pericentromérica do braço longo do maior par metacêntrico (par 1). Esta região cromossômica se mostrou heterocromática e rica em pares de bases GC (CMA<sub>3</sub>+ / DAPI-) (Figura 8, em destaque). As demais regiões heterocromáticas em ambas as espécies se mostraram reduzidas com disposição preferencialmente centromérica.

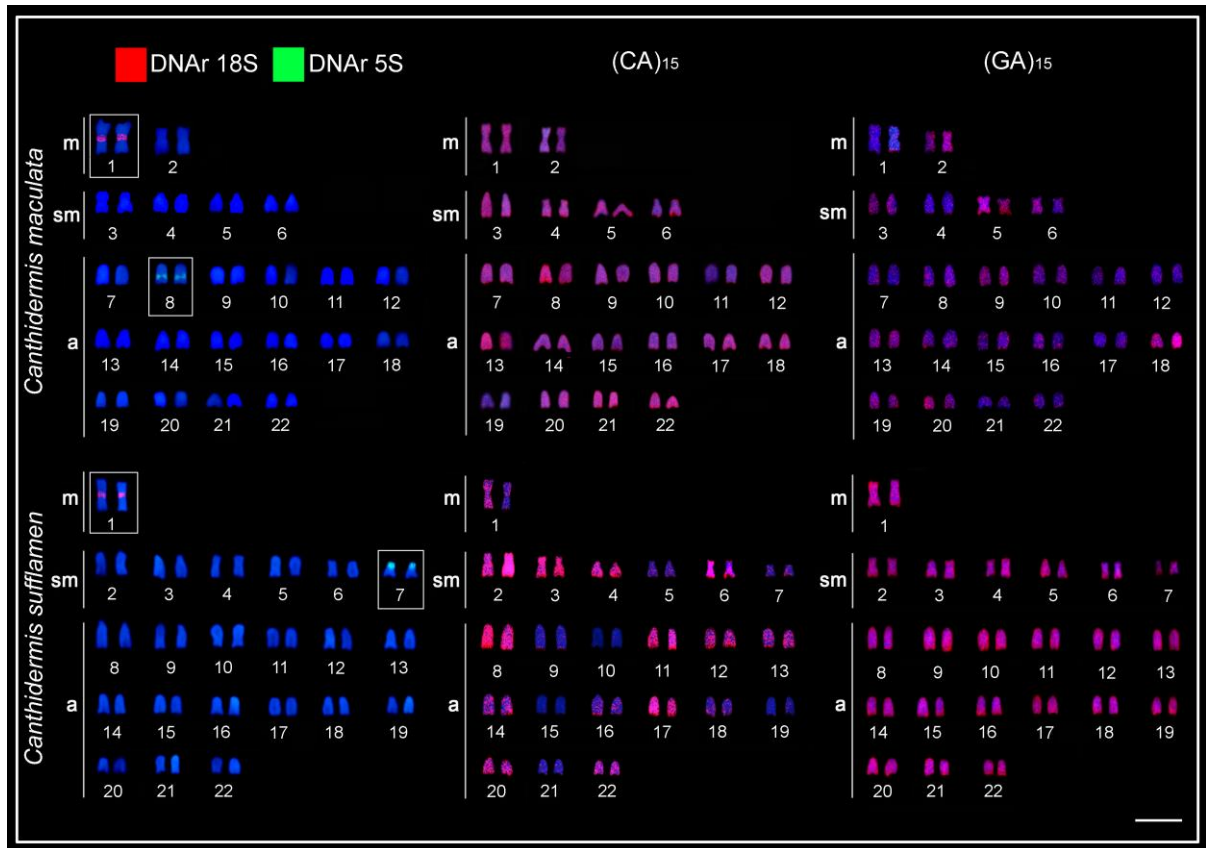




**Figura 8.** Cariótipos de *Canthidermis maculata* e *Canthidermis sufflamen* sob coloração com Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas, pares portadores de sítios Ag-RONs e regiões CMA+/DAPI-, respectivamente. Barra = 5  $\mu$ m.

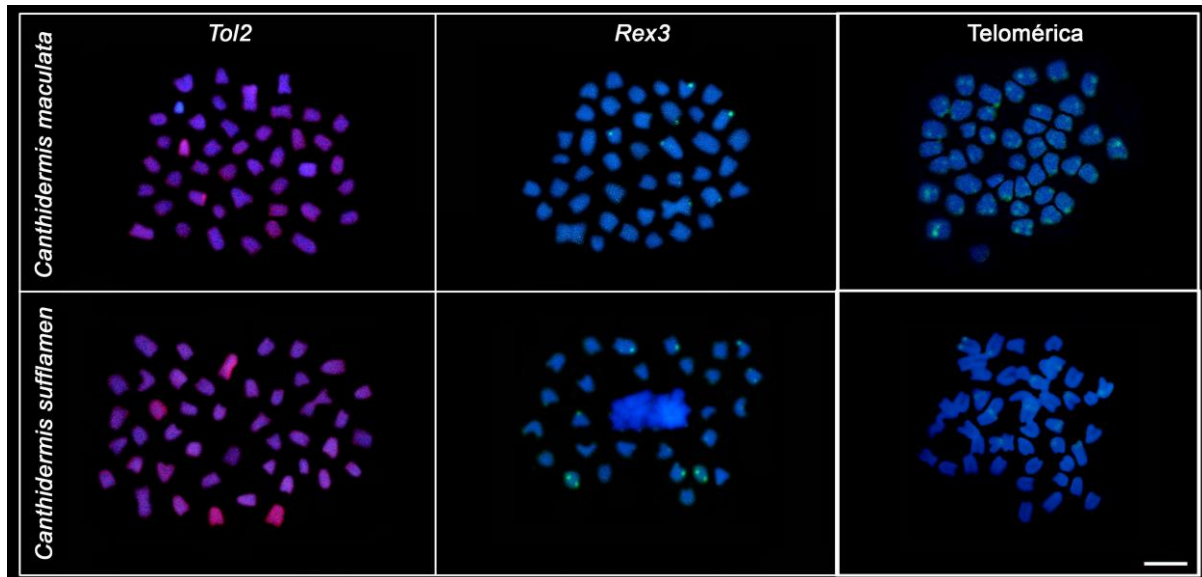
O mapeamento de sequências de DNAr 18S indicou congruência com os sítios Ag-RONs (Figura 9). Os sítios DNAr 5S são simples, localizados na posição intersticial dos braços longos do par 8 (acrocêntrico) em *C. maculata* e nos braços curtos do par 7 (submetacêntrico), em *C. sufflamen* (Figura 9).

As sequências microssatélites (CA)<sub>15</sub> e (GA)<sub>15</sub> apresentaram um padrão de hibridização em geral difuso nos cromossomos, com algum acúmulo em regiões centroméricas e na posição terminal de alguns poucos pares de cromossomos (Figura 9). Este padrão de distribuição também foi observado para os elementos transponíveis *Tol2* e *Rex3* (Figura 10).



**Figura 9.** Hibridização fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) e microssatélites (GA)<sub>15</sub> e (CA)<sub>15</sub>, em cromossomos de *Canthidermis maculata* e *Canthidermis sufflamen*. Barra = 5µm.

Em ambas as espécies, as sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> estavam localizadas exclusivamente nas regiões terminais dos cromossomos (Figura 10).



**Figura 10.** Hibridização fluorescente *in situ* de elementos transponíveis *Tol2*, *Rex3* e sequências teloméricas em *Canthidermis maculata* e *Canthidermis sufflamen*. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

Tetraodontiformes se mostra bastante heterogêneo quanto a diversidade numérica e estrutural dos cariótipos em seus diferentes grupos. De fato, enquanto a família Triacanthidae, exibe  $2n=48$  e  $NF=48$  (Rishi, 1973; Choudhury *et al.*, 1982), condição considerada basal e amplamente difundida entre vários grupos de Percomorpha (Motta-Neto *et al.*, 2019), outras como Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Tetraodontidae e Diodontidae, apresentam cariótipos com valores diploides ( $2n=28$  à 50) e  $NF$  ( $NF=33$  à 78) muito divergentes. Essas variações, são decorrentes das diferentes tendências carioevolutivas (Sá-Gabriel e Molina, 2005).

Em Balistidae os valores  $2n$  variam entre 36-46 cromossomos e cariótipos preferencialmente compostos por cromossomos acrocêntricos (Tabela 3). Embora, *C. maculata* e *C. sufflamen* compartilhem cariótipos com  $2n=44$  cromossomos, como a maioria do grupo, mostraram-se variáveis em relação ao número de cromossomos bbraquiais. As modificações cariotípicas neste grupo, aparentemente foram preferencialmente mediadas por eventos de fusões (Lima *et al.*, 2011), com a participação de inversões pericêntricas.

**Tabela 3.** Dados citogenéticos de espécies da família Balistidae.

<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>Cariótipo</b>	<b>NF</b>	<b>Região</b>	<b>Referências</b>
<i>Balistapus undulatus</i>	42	42st/a	42	Pacífico	Takai e Ojima, 1987
<i>Balistes capriscus</i>	44	44a	44	Mediterrâneo	Thode <i>et al.</i> , 1994
<i>Balistes vetula</i>	44	44a	44	Atlântico	Sá-Gabriel e Molina, 2005
<i>Balistooides conspicillus</i>	44	44st/a	44	Pacífico	Sá-Gabriel e Molina, 2005
<i>Balistooides viridescens</i>	44	2m+2sm+40st/a	48	Indo-Pacífico	Supiwong <i>et al.</i> , 2013
<i>Canthidermis maculata</i>	44	4m+8sm+32a	56	Atlântico	<b>Presente estudo</b>
<i>Canthidermis sufflamen</i>	44	2m+12sm+20a	58	Atlântico	<b>Presente estudo</b>
<i>Melichthys niger</i>	40	40a	40	Atlântico	Sá-Gabriel e Molina, 2005
<i>Melichthys vidua</i>	40	40st/a	40	Indo-Pacífico	Kitayama e Ojima, 1984
<i>Odonus niger</i>	42	42st/a	42	Indo-Pacífico	Kitayama e Ojima, 1984
<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	44	2m+42st/a	46	Pacífico	Arai e Nagaiwa, 1976
<i>Rhinecanthus aculeatus</i>	44	44a	44	Pacífico	Arai e Nagaiwa, 1976
<i>Rhinecanthus echarpe</i>	44	44st/a	44	Indo-Pacífico	Kitayama e Ojima, 1984
<i>Rhinecanthus verrucosus</i>	44	44a	44	Pacífico	Arai e Nagaiwa, 1976
<i>Sufflamen chrysopterus</i>	46	46a	46	Pacífico	Arai e Nagaiwa, 1976
<i>Sufflamen fraenatus</i>	46	46a	46	Pacífico	Takai e Ojima, 1987

Os sítios Ag-RONs se mostram simples, localizados em posição intersticial em um grande par de cromossomos acrocêntrico em algumas espécies de Balistidae (Lima *et al.*, 2011) ou metacêntricos, como nas duas espécies analisadas. Essa condição permite indicar o par portador das RONS como um grupo de ligação homeólogo e mantido apesar de rearranjos que possam atuar na ordem dos seus genes. As variações morfológicas destes pares destacam a ocorrência de inversões pericêntricas na alteração dos perfis cariotípicos do gênero *Canthidermis*.

O bandamento C evidenciou de blocos heterocromáticos reduzidos. A indicação de baixo conteúdo de heterocromatina nas espécies, pode refletir uma eventual perda de sequências de DNA repetitivo durante o processo carioevolutivo (Petrov, 2001).

A organização física independente das famílias multigênicas DNAr 18S e DNAr 5S nos cromossomos é comum na maioria dos grupos de peixes (Martins e Wasko,

2004). A localização dessas sequências em cromossomos homeólogos entre as duas espécies de *Canthidermis* destaca o exíguo dinamismo evolutivo associado a estas famílias multigênicas no grupo.

Em diversos vertebrados, os genes RNAr 5S estão localizados sobre um único par cromossômico (Suzuki *et al.*, 1996), embora em peixes possam ser encontrados em um a diversos pares (Lima-Filho *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2017). Contrariamente, a posição terminal encontrado na espécie *C. sufflamen*, a ocorrência dos sítios ribossomais DNAr 5S em posição intersticial no par 8, em *C. maculata*, é comumente observada em peixes, sugerindo algum grau de proteção contra eventos disruptivos promovidos por rearranjos estruturais (Mantovani *et al.*, 2005). Sequências DNAr 5S situada em apenas um par cromossômico têm sido descrito em vários grupos de peixes, como Serranidae, Lutjanidae e Haemulidae (Sola *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2016; Motta-Neto *et al.*, 2019). Este aspecto parece representar uma condição ancestral para o grupo (Martins e Galetti, 1999; 2001), em virtude de ser representativa em Teleósteos com cariótipos tipicamente basais ( $2n=48$  acrocêntricos). É conveniente aludir que a organização cromossômica do DNAr associada a um conteúdo heterocromático moderado, tem sido apontada como característica basal (Galetti *et al.*, 2000) e em grande parte das espécies de Tetraodontiformes (Grützner *et al.*, 1999; Mandrioli, 2000; Fischer *et al.*, 2004; Sá-Gabriel e Molina, 2005; Noletto *et al.*, 2007).

Os elementos transponíveis podem acarretar mutações e/ou alterações a expressão ou na estrutura de genes (Kappitonov e Jurka, 2007), exercendo alterações estruturais e funcionais no genoma (Böhne *et al.*, 2008), dentre as quais o aumento ou diminuição do tamanho (Feschotte e Prithman, 2007). Nas espécies de *Canthidermis* os elementos *Tol2* e *Rex3* ocorrem ao longo dos cromossomos das espécies englobando regiões eucromáticas dos cromossomos, diferentemente de distribuições co-localizadas com regiões ricas em heterocromatina, presentes em muitos grupos de Percomorpha (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2011).

A distribuição difusa dos elementos transponíveis é inteiramente congruente com a das sequências microssatélites, que reconhecidamente apresentam altas taxas de mutação (Jarne e Lagoda, 1996) e níveis muito variáveis de acúmulo nos cromossomos dos peixes (Cioffi *et al.*, 2012; Lima-Filho *et al.*, 2014). Este padrão

sugere uma negligenciável participação da heterocromatina como reservatórios de sequências repetitivas nos cromossomos destas espécies.

Apesar da marcante redução do cariótipo permitir a inferência de fusões cromossômicas em Balistidae, o mapeamento de sequências teloméricas, que em vários grupos de peixes indicar rearranjos associados à fusões (Jacobina *et al.*, 2011; Cioffi *et al.*, 2011), não revelou sítios teloméricos internos (ITS). Esta condição relacionado a perda destas sequências durante a fusão ou descaracterização histórica derivada do acúmulo de mutações ou heterocromatinização (Getlekha *et al.*, 2016).

Os padrões citogenômicos entre as espécies de *Canthidermis* evidenciou algum conservadorismo microestrutural dos cromossomos e um baixo conteúdo heterocromático. Em contraste com vários grupos de Percomorpha (e.g. Costa *et al.*, 2015, 2016), as heterocromatinas se apresentaram como um reduzido repositório de sequências repetitivas no genoma, como elementos transponíveis e repetições microsatélites. Os padrões cariotípicos da família Balistidae apontam uma marcada variação estrutural dos cromossomos e redução no valor diploide, indicando a ocorrência aditiva de processos de fusão cromossômica e eventos de inversões pericêntricas na modelagem cariotípica do grupo.

## REFERÊNCIAS

- Amorim, K.D.J., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Soares, R.X., Calado, L.L., Borges, A. T., Molina, W.F. (2017). Interregional cytogenetic comparisons in *Halichoeres* and *Thalassoma* wrasses (Labridae) of coastal and insular regions of the Southwestern Atlantic. *Genetics and Molecular Research*, 16: 1–12.
- Arai, R., Nagaiwa, K. (1976). Chromosomes of Tetraodontiform fishes from Japan. *Bulletin National Science Museum*, 2: 59-72.
- Biscotti, M.A., Olmo, E., Heslop-Harrison, J.S. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23: 415–420.
- Blackburn, E.H., Szostak, J.W. (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annual Review Biochemistry*, 53: 163–194.
- Böhne, A., Brunet, F., Galiana-Arnoux, D., Schultheis, C., Volff, J.N. (2008). Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.
- Brainerd, E., Slutz, S., Hall, E., Phillis, R. (2001). Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution*, 55: 2363–68.

- Choudhury, R.C., Prasad, R., Das, C.C. (1982). Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia*, 728-732.
- Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C. (2012). Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in Fish. In: Garrido-Ramos MA (ed): Repetitive DNA. Genome dynamics Basel, Karger, 7:197–221.
- Cioffi, M.B., Kejnovsky, E., Marquioni, V., Poltronieri, J., Molina, W.F., Diniz, D., Bertollo, L.A.C. (2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular Cytogenetics*, 5: 28.
- Cioffi, M.B., Molina, W.F., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. (2011). Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. *Cytogenetic and Genome Research*, 134: 295–302.
- Costa, GW, Cioffi, Mde B, Bertollo, LA, Molina, WF. (2015). Structurally complex organization of repetitive DNAs in the genome of *Cobia (Rachycentron canadum)*. *Zebrafish*, 12 :215-220.
- Costa, G.W.W.F., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2016). The evolutionary dynamics of ribosomal genes, Histone H3, and transposable Rex elements in the genome of Atlantic snappers. *The Journal of Heredity*, 107: 173-180.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51: 127–28.
- Elgar, G., Clark, M.S., Meek, S., Smith, S.(1999). Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning. *Genome Research*, 9: 960–971.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R., Van der Laan, R. (2020). Catalog of fishes: genera, species, references. Available in <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. California Academy of Sciences. Electronic version accessed April 02-2020.
- Ferreira, D.C., Oliveira, C., Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 64-70.
- Feschotte, C., Pritham, E.J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*, 41: 331-368.
- Fischer, C., Bouneau, L., Coutanceau, J., Weissenbach, J., Volff, J., Ozouf-Costaz, C. (2004). Global heterochromatic localization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 336: 175-183.



- Galetti Jr., P.M., Aguilar, C.T., Molina, W.F. (2000). An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420: 55–62.
- Getlekha, N., Molina, W.F., Cioffi, M.B., Yano, C.F., Maneechot, N., Bertollo, L.A.C., Supiwong, W., Tanomtong, A. (2016). Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). *Genetica*, 144: 203–211.
- Gold, J. R., Li, Y.C., Shipley, N.S., Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563–575.
- Gross, M.C., Schneider, C.H., Valente, G.T., Porto, J.I.R., Martins, C., Feldeberg, E. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic Genome Research*, 127: 43–53
- Grützner, F., Lütjens, G., Rovira, C., Barnes, D., Ropers, H-H., Haaf, T. (1999). Classical and molecular cytogenetics of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Chromosome Research*, 7: 655–662.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2011). Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal*, 66:18–33.
- Howell, W.M., Black, D.A. (1980). Controlled Silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Jacobina, U.P., Cioffi, M.B., Souza, L.G.R., Calado, L.L. (2011). Chromosome mapping of repetitive sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae): Implications for karyotypic evolution and perspectives for biotechnological uses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 1–8.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424-429.
- Kappitonov, V.V., Jurka, J. (2007). Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics*, 23: 521-529.
- Kawakami, K., Shima, A. (1999). Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 240: 239–244.
- Kitayama, E., Ojima, Y. (1984). Preliminary report on the Phylogeny of five balistid fish in terms of several chromosome banding techniques in combination with a statistical analysis. *Proceedings of the Japan Academy Series*, 60: 95-197.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.



- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220.
- Lima, L.C.B., Martinez, P.A., Molina, W.F. (2011). Cytogenetic characterization of three Balistoidea fish species from the Atlantic with inferences on chromosomal evolution in the families Monacanthidae and Balistidae. *Comparative Cytogenetics*, 5: 61–69.
- Lima-Filho, P.A., Bertollo, L.A.C., Cioffi, M.B., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2014). Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: Darter and emerald gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenetic and Genetics Research*, 142: 197–203.
- Loh, Y., Brenner, S., Venkatesh, B. (2008). Investigation of loss and gain of introns in the compact genomes of pufferfishes (*Fugu* and *Tetraodon*). *Molecular Biology and Evolution*, 25: 526–35.
- Mandrioli, M. (2000). Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Research*, 8: 237–242.
- Martinez, P. A., Araujo, W. C., Molina, W. F. (2010). Derived cytogenetic traits, multiple NORs and B chromosomes in the compact karyotype of *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes). *Marine Genomics*, 3: 85–89.
- Martins, C., Wasko, A.P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C. R. (Eds.). *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 335-363.
- Martins, C., Galetti Jr. P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, C., Galetti Jr., P.M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111: 439–446.
- Mantovani, M., Abel, L.D.S., Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123: 211-216.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellmam, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613-616.
- Motta-Neto, C.C., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2011). Molecular cytogenetic analysis of Haemulidae fish (Perciformes): Evidence of evolutionary conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 97–100.
- Motta-Neto, C.C., Cioffi, M.B. Costa, G.W.W.F., Amorim, K.D.J., Bertollo, L.A.C., Artoni, R.F., Molina, W.F. (2019). Overview on Karyotype Stasis in Atlantic

Grunts (Eupercaria, Haemulidae) and the Evolutionary Extensions for Other Marine Fish Groups. *Frontiers in Marine Science*, 6: 1–12.

Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*. New York, John Wiley & Sons Inc., 5: 752.

Noieto, R.B., Vicari, M.R., Cipriano, R.R., Artoni, R.F., Cestari, M.M. (2007). Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica*, 130: 133–138.

Noieto, R.B., Guimarães, F.S.F., Paludo, K.S., Vicari, M.R., Artoni, R.F., Cestari, M.M. (2009). Genome size evaluation in tetraodontiform fishes from the neotropical region. *Marine Biotechnology*, 11, 680–685.

Ozouf-Costaz, C., Brandt, J., Korting, C., Pisano, E., Bonillo, C., Coutanceau, J.P., Volff, J.N. (2004). Genome dynamics and chromosomal localization of the nonLTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science*, 16: 51–57

Pendás, A.M., Morán, P., García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*, 103: 147–152.

Petrov, D.A. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*, 17: 23–28.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2928.

Rishi, K.K. (1973). A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Res. Bull (N.S.) Panjaba Universtiy*, 24: 161–162.

Sá-Gabriel, L.G., Molina, W.F. (2005). Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae e Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58: 229-237.

Suzuki, H., Sakurai, S., Matsuda, Y. (1996). Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72: 1-4.

Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.

Sola, L., De Innocentiis, S., Gornung, E., Papalia, S., Rossi, A. R., Marino, G., De Marco, P., Cataudella, S. (2000). Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence. *Marine Biology*, 137: 47–51.

- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304–306.
- Supiwong, W., Alongklod, T., Sarun, J., Suthip, K. et al. (2013). Standardized karyotype and ideogram of titan triggerfish, *Balistoides viridescens* (Tetraodontiformes, Balistidae) in Thailand. *Cytologia*, 78: 345–51.
- Takai, A., Ojima, Y. (1987). Comparative chromosomal studies in three balistid fishes. *Kromosomo*, 7-48.
- Thode, G., Amores, A., Martinez, G. (1994). The karyotype of *Balistes Carolinensis gmelin* (Pisces, Tetraodontiformes) a specialized species. *Caryologia*, 47: 257-263.
- Valente, G.T., Mazzuchelli, J., Ferreira, I.A., Poletto, A.B. (2011). Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133, 34–42.
- Volff, J.N., Körting, C., Scharl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673–1684.
- Volff, J.N., Korting, C., Sweeney, K. Charlesworth, Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the Fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to methods and applications*. Academic Press Inc., 315–322.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os padrões citogenômicos revelados para duas espécies de larga distribuição para a família Gempylidae, revelaram uma marcada diversificação cromossômica estrutural, sobretudo mobilizadas por inversões pericêntricas, que pode estar associada à aquisição de características adaptativas, e à particularidades ecológicas e populacionais de espécies habitantes de ambientes marinhos profundos.
- O conjunto de dados citogenéticos da família Balistidae, aliado aos presentes achados, indica que processos de fusões cromossômicas e inversões pericêntricas foram predominantes na modelagem deste grupo de Tetraodontiformes.
- Apesar das variações estruturais entre os cromossomos das espécies de *Canthidermis* (Balistidae), o compartilhamento de um mesmo valor diploide e similaridades na organização de sequências repetitivas dos cromossomos, sugerem que estas espécies ainda compartilham largos conjuntos sintênicos.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- Alarcón, M., Eslava, N., González, L.W., Guevara, F. (2017). Crecimiento y mortalidad del pez *Canthidermis sufflamen* (Perciformes: Balistidae) de los archipiélagos Los Frailes y Los Testigos, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 65: 858–867.
- Amorim, K.D.J., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Soares, R.X., Calado, L.L.; Borges, A.T.; Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2016). Interregional cytogenetic comparisons in *Halichoeres* and *Thalassoma* wrasses (Labridae) of coastal and insular regions of the southwestern Atlantic. *Genetics and Molecular Research*, 16.
- Arai, K. (2011). *Fish Karyotypes - A Check List*. New York: Springer.
- Bacurau, T.O.F., Molina, W.F. (2004). Karyotypic diversification in two atlantic species of Holocentridae (Pisces, Beryciformes). *Caryologia*, 57: 300-304.
- Baldwin, C.C., Castillo, C.I., Weight, L.A., Victor, B.C. (2011). Seven new species within western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (Teleostei, Labrisomidae), with comments on congruence of DNA barcodes and species. *Zookeys*, 3: 21–72.
- Barange, M., Field, J.G., Harris, R.P., Hofmann, E.E., Perry, R.I., Werner, F.E. (2010). *Change, Marine ecosystems and global*. Oxford, Oxford Univ. Press 412.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, 197: 283-301.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal Genetics*, 2: 17-37.
- Betancur, R.R., Broughton, R.E, Wiley, E.O., Carpenter, K., López, J.A., Chenhong, L., Holcroft, N.I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton, J.C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M.A., Ballesteros, J.A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, A.C., Rowley, T., Reneau, P.C., Hough, D., Lu, G., Grande, T., Arratia, G., Orti, G. (2013a). The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLOS Currents Tree of Life*, 1–54.
- Brum, M.J.I. (1996). Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 421-427.
- Byrkjedal, I., Rees, D.J., Willassen, E. (2006). Lumping lumpsuckers: molecular and morphological insights into the taxonomic status of *Eumicrotremus spinosus* (Fabricius, 1776) and *Eumicrotremus eggvinii* (Koefoed, 1956) (Teleostei: Cyclopteridae). *Journal of Fish Biology*, 71: 111–131.
- Campos, T.F.C., Neto, J.V., Srivastava, N.K., Hartmann, L.A., Moraes, J.F.S., Mendes, L., Silveira, S.R.M. (2005). Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Soerguimento tectônico de rochas infracrustais no Oceano Atlântico Arquipélago de São Pedro e São Paulo Soerguimento tectônico de rochas infracrustais no Oceano Atlântico. *Sítios Geológicos e Paleontológicos Do Brasil*, 1–12.

- Chen, T.C., Ormond, R.F.G., Mok, H.K. (2001). Feeding and territorial behaviour in juveniles of three co-existing triggerfishes. *Journal of Fish Biology*, 59: 524–32.
- Clark, E., Nelson, D.R., Dreyer, R., Pkwy, K.T. (2015). Nesting sites and behavior of the deep water triggerfish *Canthidermis maculata* (Balistidae) in the Solomon Islands and Thailand. 21.
- Colaço, A., Silva, M., Giacomello, E., Gordo, L., Vieira, A., Adão, H., Gomes-Pereira, J. N., Menezes, G., Barros, I. (2017). *Ecossistemas do Mar Profundo*. DGRM, Lisboa, Portugal. E-book. Disponível em: <[www.sophia-mar.pt](http://www.sophia-mar.pt)>, Acesso em: 14/04/2020.
- Costa, G.W.W.F., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2013). Transposable elements in fish chromosomes: A study in the marine *Cobia* species. *Cytogenetic and Genome Research*, 141: 126-132.
- Cunha, I.M.C., Souza, A.S., Dias Jr, E.A., Amorim, K.D.J., Soares, R.X., Costa, G.W.W.F., Machado, E.G., Galetti Jr., P.M., Molina, W.F. (2014). Genetic multipartitions based on D-Loop sequences and chromosomal patterns in *Brown Chromis* (Pomacentridae), in the Western Atlantic. *BioMed Research International*, 1-11.
- Dias, A.L., Giuliano-Caetano, L. (2002). Citogenética de alguns grupos de peixes da bacia do rio Tibagi. *Fundação Araucária*. 473 - 531.
- Eschmeyer, W.N., Fong, J.D. (2020). SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Electronic version accessed 20-04-2020.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R., Van der Laan, R. (2020). Catalog of fishes: genera, species, references. Available in <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. California Academy of Sciences. Electronic version accessed July 10 2018.
- Feitoza, B.M., Rocha, L.A., Luiz-Júnior, O.J., Floeter, S.R., Gasparini, J.L. (2003). Reef fishes of St. Paul's Rocks: new records and notes on biology and zoogeography. *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 7: 61-82.
- Ferreira, I.A., Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39: 411-418.
- Galand, P.E., Potvin, M., Casamayor, E.O., Lovejoy, C. (2010). Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *The ISME Journal*, 4: 564–576.

- Galvão, T.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2011). Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidae species (Perciformes). *Comparative Cytogenetics*, 5, 259-275.
- Gastauer, S., Scouling, B., e Parsons, M. (2017). Towards acoustic monitoring of a mixed demersal fishery based on commercial data: the case of the Northern demersal scalefish fishery (Western Australia). *Fisheries Research* 195: 91–104.
- Gold, J.R., Li, Y.C., Shipley, N.S., Powers, P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563–575.
- Hazin, F.H.V, Viana, D.L., Pinheiro, D., Fischer, A., Macena, B., Veras, D., Oliveira, P., Carvalho, F., Vaske, T., Branco, I. (2009). [in]; Viana, D. L., Hazin, F. H. V. and Carvalho, M. A. (Orgs.) *O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de estação científica*. Brasília: SECIRM. 226 - 233.
- Howell, W.M., Black, D.A. (1980). Controlled Silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Jacobina, U.P., Martinez, P.A., Cioffi, M.B., Garcia, J., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2014). Morphological and karyotypic differentiation in *Caranx lugubris* (Perciformes: Carangidae) in the St. Peter and St. Paul Archipelago, mid-Atlantic Ridge. *Helgoland Marine Research*, 68: 17-25.
- Jankun, M., Kuzminski, H., Furgala-Selezniow, G. (2007). Cytologic ploidy determination in fish—an example of two salmonid species. *Environmental Biotechnology*, 3: 52–56.
- Kawakami, K., Shima, A. (1999). Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 240: 239–244.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.
- Lara, A., Ponce de León, J.L., Rodríguez, R., Casane, D., Côte, G., Bernatchez, L., García-Machado, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10: 421–430.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220.
- Lima, L.C.B., Martinez, P.A., Molina, W. F. (2011). Cytogenetic characterization of three Balistoidea fish species from the Atlantic with inferences on chromosomal evolution in the families Monacanthidae and Balistidae. *Comparative Cytogenetics*, 5: 61-65.

- Lorenzo, J.M., Pajuelo, J.G. (1999). Biology of a deep benthopelagic fish, roudi escolar *Promethichthys prometheus* (Gempylidae) off the Canary Islands. *Fisheries Bulletin*, 97: 92-99.
- Luz, N.C., Coimbra, J.C. (2014). New species of Xestoleberididae (Crustacea, Ostracoda) from Archipelago of São Pedro and São Paulo, Equatorial Atlantic. *Iheringia, Série Zoologia*, 470-477.
- Macedo-Soares, L.C.P., Freire, A.S., Muelbert, J.H. (2012). Small-scale spatial and temporal variability of larval fish assemblages at an isolated oceanic island. *Marine Ecology Progress Series*, 444: 207-222.
- Matos-Caraballo, D., Cartagena-Haddock, M., Penã-Alvarado, N. (2007). By-catch study of the Puerto Rico's marine commercial fisheries. In 'Proceedings of the 58th Gulf and Caribbean Fisheries Institute', November 2008, San Andres, Colombia. pp. 139–150.
- Matsuura, K. (2014). Taxonomy and systematics of Tetraodontiform fishes: a Review focusing primarily on progress in the period from 1980 to 2014. *Ichthyological Research*, 62: 72–113.
- Miguens, A.P. (2005). *Navegação Costeira, Estimada e em Águas Restritas*. Volume I. Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha. Rio de Janeiro.
- Molina, W.F., Amorim, K.D., Soares, R.X., Costa, G.W.W.F., Morra Neto, C.C., Souza, A.S., Lima Filho, P.A. (2018). Carioevolução e aspectos da Filogeografia Insular de peixes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. *Arquipélago de São Pedro e São Paulo 20 anos de pesquisa*, 99-110.
- Molina, W.F., Bacurau, T.O.F. (2007). Structural and numerical chromosome diversification in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia*, 71: 237–242.
- Molina, W.F. (2007). Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: *Fish cytogenetics* (Pisano, E, Ozouf-Costaz, C, Foresti, F., Kapoor, B.G., eds.). Science Publishers, Enfield, 69-110.
- Molina, W.F., Galetti Jr. P.M. (2004). Multiple pericentric inversions and chromosome divergence in the reef fishes *Stegastes* (Perciformes, Pomacentridae). *Genetics and Molecular Biology*, 27: 543-548.
- Molina, W.F., Jacobina, U.P. (2013). Protocolos citogenéticos e perspectivas biotecnológicas voltadas à piscicultura marinha e conservação. *Biota Amazônia*, 3: 155–168.
- Molina, W.F., Motta-Neto, C.C., Sena, D.C.S., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C. (2012). Karyoevolutionary aspects of Atlantic hogfishes (Labridae). *Marine Genomics*, 6: 25-31.



- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613-616.
- Motta-Neto, C.C., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F. (2011). Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 401: 75-79.
- Motta-Neto, C.C., Cioffi, M.B., Costa, G.W.W.F., Amorim, K.D.J., Bertollo, L.A.C., Artoni, R.F., Molina, W.F. (2019). Overview on Karyotype Stasis in Atlantic Grunts (Eupercaria, Haemulidae) and the Evolutionary Extensions for Other Marine Fish Groups. *Frontiers in Marine Science*, 6: 1–12.
- Nakamura, I., Parin, N.V. (1993). FAO species catalogue. Snake mackerels and cutlassfishes of the world (families Gempylidae and Trichiuridae). *FAO Fisheries Synopsis*, 15: 1-136.
- Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H. (2016). *Fishes of the World*. New York, John Wiley & Sons Inc., 5: 752.
- Oleksiak, M.F. (2010). Genomic approaches with natural fish populations. *Journal of Fish Biology*, 76: 1067–93.
- Oliveira, G.M., Evangelista, J.E.V., Ferreira, B.P. (1997). Considerações sobre a biologia e a pesca no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. *Boletim Técnico Científico do CEPENE*, 5: 1-16.
- Pendás, A.M., Morán, P., García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*, 103: 147–152.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2928.
- Post, A. (1974). Ergebnisse der Forschungsreisen des FFS "Walther Herwig" nach Sudamerika. XXXIV. Die Chromosomen von drei Arten aus der Familie Gonostomatidae(Osteichthyes, Stomiatoidei). *Arch. FischWiss*, 25: 51-55.
- Ramirez-Llodra, E., Tyler, P.A., Baker, M.C., Bergstad, O.A., Clark, M.R., Escobar, E., Levin, L.A., Menot, L., Rowden, A.A., Smith, C.R., Van Dover, C.L. (2011). Man and the Last Great Wilderness: Human Impact on the Deep Sea., *PLoS One* 6.
- Ray, D., Mohapatra, A. (2020). New record of five ornamental triggerfishes (Tetraodontiformes: Balistidae) from West Bengal coast, India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 49: 102–107.
- Rosa, M.R., Alves, A.C., Medeiros, D.V., Coni, E.O.C., Ferreira, C.M., Ferreira, B.P., Rosa, R.S., Amado-Filho, G.M., Pereira-Filho, G.H., Moura, R.L., Thompson,

- F.L., Sumida, P.Y.G., Francini-Filho, R.B. (2016). Mesophotic reef fish assemblages of the remote St. Peter and St. Paul's Archipelago, Mid-Atlantic Ridge, Brazil. *Coral Reefs*, 35: 113–123.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Soares, R.X., Bertollo, L.A.C., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2013). Karyotype stasis in four Atlantic Scombridae fishes: mapping of classic and dual-color FISH markers on chromosomes. *Fisheries Science*, 79: 177-183.
- Soares, R.X., Bertollo, L.A.C., Cioffi, M.B., Costa, G.W.W.F., Molina, W.F. (2014). Chromosomal distribution of two multigene families and the unusual occurrence of an X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system in the dolphinfish (*Coryphaenidae*): evolutionary aspects. *Genetics and Molecular Research*, 13: 2470-2479.
- Soares, R.X., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Borges, A.T., G.W.W.F., Molina, W.F. (2017). Chromosomal evolution in large pelagic oceanic apex predators, the barracudas (*Sphyraenidae*, *Percomorpha*). *Genetics and Molecular Research*, 16.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304–306.
- Trivedi, S., Aloufi, A.A., Ansari, A.A., Ghosh, S.K. (2015). Role of DNA Barcoding in Marine Biodiversity Assessment and Conservation: An update. *Sau. Journal of Biological Sciences*, 23: 161–171.
- Uiblein, F., Gouws, G. (2015). Distinction and relatedness – Taxonomic and genetic studies reveal a new species group of goatfishes (*Upeneus*; *Mullidae*), *Mar. Bio. Res.*, 11: 1021–1042.
- Vasconcelos, A.J.M., Molina, W.F. (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 32: 83-90.
- Vaske Jr., T., Lessa, R.P., de Nóbrega, M., Montealegre-Quijano, S., Marcante Santana, F., Bezerra, J.L. (2005). A checklist of fishes from Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 75–79.
- Vaske Jr., T., Lessa, R.P., Ribeiro, A.C.B., Nóbrega, M.F., Pereira, A.A. Andrade, C. D.P. (2006). A pesca comercial de peixes pelágicos no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Brasil. *Tropical Oceanography*, 34: 31-41.
- Vaske Jr. T., Lima, K.L., Ribeiro, A.C.B., Lessa, R. (2008). Record of the St. Helena deepwater scorpionfish, *Pontinus nigropunctatus* (Günther) (*Scorpaeniformes*: *Scorpaenidae*), in the Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 46-48.

- Viana, D.L., Travassos, M., Porto, M., Vaske, T., Hazin, F. (2012). Diet of the oilfish *Ruvettus pretiosus* (Perciformes: Gempylidae) in the Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60: 183-190.
- Viana, D.F., Vieira Hazin, F.H., Andrade, H.A., Nunes, D.M., Viana, D.L. (2015). Fisheries in the Saint Peter and Saint Paul archipelago: 13 years of monitoring. *Boletim Do Instituto de Pesca*, 41: 239–248.
- Volff, J.N., Körting, C., Scharl, M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673–1684.
- Volff, J.N., Korting, C., Sweeney, K., Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the Fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., 315–322.
- Zhou, G.Z., Gui, L., Li, Z.Q., Yuan, X.P., Zhang, Q.Y. (2008). Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus. *Journal of Fish Biology*, 73: 2058–2067.