



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCENCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA



**Diversidade cromossômica e padrões ecomorfológicos
em Gobiidae (Perciformes) no litoral e ilhas oceânicas
do Brasil**

Paulo Augusto de Lima Filho

**Natal - RN
2015**

Diversidade cromossômica e padrões ecomorfológicos em Gobiidae
(Perciformes) no litoral e ilhas oceânicas do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia/PPGE da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Paulo Augusto de Lima Filho

Orientador: Prof. Dr. Wagner Franco Molina
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Natal - RN
2015

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Lima Filho, Paulo Augusto de.

Diversidade cromossômica e padrões ecomorfológicos em Gobiidae (Perciformes) no litoral e ilhas oceânicas do Brasil / Paulo Augusto de Lima Filho. – Natal, RN, 2015.

155 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Franco Molina.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

1. Evolução cromossômica – Tese. 2. Estratificação populacional. – Tese. 3. Dimorfismo sexual. – Tese. I. Molina, Wagner Franco. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

Diversidade cromossômica e padrões ecomorfológicos em Gobiidae
(Perciformes) no litoral e ilhas oceânicas do Brasil

Paulo Augusto de Lima Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia/PPGE da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo
(Membro externo – UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi
(Membro externo – UFSCar)

Prof. Dr. Vitor Oliveira Lunardi
(Membro externo – UFERSA)

Prof. Dr. José Garcia Junior
(Membro externo – IFRN)

Prof. Dr. Wagner Franco Molina
(Presidente da Banca – UFRN)

*“Aprender é algo
que nunca se cansa,
nunca se tem medo e
nunca se arrepende”.
(Leonardo da Vinci)*

*“A meu pai e mães, familiares,
amigos e colegas, pelo apoio,
confiança e paciência, dedico”.*

AGRADECIMENTOS

Não só nesta trajetória, mas durante toda a vida em cuja presença eu estou agora, agradeço a Deus, pois me presenteia com a humildade, simplicidade, amor e felicidade.

À presença familiar que me traz compreensão, carinho e paciência. Pais, Paulo Augusto de Lima, Maria da Conceição Dutra de Andrade e “boadrasta” Geovana da Silva Nascimento.

Às mães que sempre me apoiam e auxiliam: Dailva Bezerra, Joilza Cortez, Fátima (Tatinha), Rita Neide, Gracinet e Ivanoska de Lucena.

Aos tios e tias, dedico gratidão adicional pelo apoio neste sonho: Hugo, Dedé, Garibadi, Nercy e Socorro, que me acolheram e auxiliaram durante toda esta trajetória no Rio Grande do Norte.

Aos irmãos, Henrique, Ricardo, Isaura, Tatiane e José, que me dão forte base familiar. Sobrinhos, Felipe, Victor, Ane, Júlia, Isabela, Guilherme e aos muitos primos.

Aos antigos e aos novos amigos que conquistei nesta jornada, desde o Cursinho da Poli, CEDAP, graduação e pós-graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Aos colegas residentes de repúblicas, Rogerson Rodrigues, Carlos Eduardo e Helena, amigos que me apoiaram e incentivaram durante todo desenvolvimento acadêmico.

Amigos e companheiros de trabalho do Instituto Federal Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, *campi* Macau e Pau dos Ferros.

Acadêmicos que realmente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, que agora os considero como amigos e colegas de ofício.

Amigos de trabalho do Laboratório de Genética de Recursos Marinhos (UFRN), pelo ambiente que promoveram e pelos ensinamentos que melhoraram decisivamente nossa pesquisa: Allyson Souza, Amanda Borges, Aparecida, Clóvis Motta, Eurico, Gideão Wagner, Inailson Costa, Ingrid, Jeanne, Jose, Juliana Galvão, Karlla Danielle, Leonardo Calado, Roberta Godoy, Pablo Martinez, Rodrigo Xavier, Uedson Jacobina e Washington Candeia. Obrigado e parabéns a todos, verdadeiramente praticaram ciência, democratizando o conhecimento e trabalhando em equipe.

Agradeço, especialmente, a orientação do professor Dr. Wagner Franco Molina, por acompanhar e contribuir com nosso amadurecimento acadêmico e por nos orientar

com liberdade e exigência, permitindo nosso desenvolvimento científico e a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	XIII
1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	21
3. Material e métodos.....	23
4. Referências.....	32
 Capítulo 1:	
Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby <i>Bathygobius soporator</i> (Gobiidae: Perciformes)	
.....	37
 Capítulo 2:	
Multiabordagem evolutiva em espécies Atlânticas do gênero <i>Bathygobius</i> (Gobiidae): aspectos citogenéticos, morfológicos e sequências DNA barcode	
.....	58
 Capítulo 3:	
Influência latitudinal no dimorfismo sexual do peixe marinho <i>Bathygobius soporator</i> (Gobiidae: Perciformes)	
.....	81
 Capítulo 4:	
Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: darter and emerald Gobies (<i>Ctenogobius</i> , Gobiidae)	
.....	105
 Capítulo 5:	
Chromosomal mapping of repetitive DNAs in <i>Gobionellus oceanicus</i> and <i>Gobionellus stomatus</i> (Gobiidae: Perciformes): a shared XX/XY system and an unusual uneven distribution of 5S rDNA sites on the Y chromosome	
.....	119
 Capítulo 6:	
Aspectos carioevolutivos da família Gobiidae (Perciformes) e descrição citogenética de <i>Coryphopterus glaucofraenum</i> e <i>Evorthodus lyricus</i>	
.....	135
 Considerações finais:.....	154

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Mapa indica os pontos do litoral e ilhas oceânicas brasileiras utilizados para coleta de Gobiidae. **24**
- Figura 2.** Exemplares da família Gobiidae utilizados nas análises citogenéticas. *Bathygobius soporator* (a), *Bathygobius* sp.1 (b), *Bathygobius* sp.2 (c), *Ctenogobius smaragdus* (d), *Ctenogobius boleosoma* (e), *Coryphopterus glaucofraenum* (f), *Evorthodus lyricus* (g), *Gobionellus oceanicus* (h) e *Gobionellus stomatus* (i). Barras= 1 cm. **25**

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Collection sites for *B. soporator* along the Brazilian coast and Rocas Atoll sample (a); *B. soporator* specimen with the nine landmarks used for interpopulation morphological analysis (b). Schematic description of landmarks: 1. Distal extremity of the premaxillary bone; 2. Start of the first dorsal fin; 3. End of the first distal fin; 4. Start of the second dorsal fin; 5. End of the second dorsal fin; 6. End of the anal fin; 7. Start of the anal fin; 8. Start of the pelvic fin; 9. Medial position of the eye. Bar= 1,5 cm. **40**
- Figura 2.** Karyotypes of *Bathygobius soporator* populations MA, BA, RN and RA arranged from sequentially Giemsa-stained (left) and C-banded chromosomes (right). Chromosomes bearing Ag-NOR, CMA₃ + and DAPI- sites are boxed. Bar= 5 µm. **43**
- Figura 3.** Karyotypes of the *Bathygobius soporator* populations MA, BA, RN and RA arranged from chromosomes probed with 5S rDNA (green), H₁ hisDNA (red) counterstained with DAPI. Chromosomes carrying 18S rDNA (red) are boxed. Bar= 5 µm. **44**
- Figura 4.** Distribution of morphological data of *B. soporator* samples along the first and second canonical variables. The largest highlighted symbols indicate the morphometric mean of each population; (a) all populations including Rocas Atoll individuals ($CV_1=63.5\%$ and $CV_2=30.5\%$); (b) only continental populations ($CV_1=76.4\%$ and $CV_2=23.5\%$). Schematic drawings at c, d, e and f represent comparisons between morphotypes of the populations analyzed generated by CV_1 . **47**

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Pontos de coleta de *Bathygobius*, Rio Grande do Norte (RN), Atol das Rocas (RA) e Arquipélago de Fernando de Noronha (FNA). **61**
- Figura 2.** Espécies do gênero *Bathygobius* coletadas em áreas do litoral do Brasil e ilhas oceânicas e analisadas quanto a padrões citogenéticos, morfológicos e das sequências mitocondriais COI. Barra= 1 cm. **62**
- Figura 3.** Cariótipos de *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1, e *Bathygobius* sp.2 (Atol das Rocas), pela coloração convencional com Giemsa (linha superior) e bandamento C (linha inferior). Barra= 5 µm. **66**
- Figura 4.** Pares cromossômicos portadores de sítios ribossomais em (a) *Bathygobius* sp.1 (b) *B. soporator* e (c) *Bathygobius* sp.2 (Atol das Rocas) através da técnica de Ag-NOR, coloração com CMA₃ e mapeamento de sequências DNAr 18S e 5S. Barra= 5 µm. **66**
- Figura 5.** Árvore *neighbor-joining* derivada de sequências COI, de espécies do gênero *Bathygobius* presentes no Atlântico Ocidental. Dados em negrito correspondem às espécies do litoral nordeste do Brasil, do Atol das Rocas e Arquipélago de Fernando de Noronha. *Espécies de diferentes regiões do Atlântico Ocidental com sequências depositadas no GenBank. **69**
- Figura 6.** Análise de variáveis canônicas dos dados da forma corporal das espécies *B. soporator* (▷), *Bathygobius* sp.1 (□), *Bathygobius* sp.2 RA (●) *Bathygobius* sp.2 FNA (●), entre os eixos CVI e CVII (CV₁= 70,5% e CV₂= 24,5%). Símbolos maiores indicam a média morfométrica apresentada por cada espécie. Nos boxes *warped outlines* evidenciando diferenças nas formas corporais das espécies de *Bathygobius* a partir da CV₁. **70**

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Mapa das áreas de coleta de *B. soporator* ao longo do litoral brasileiro. Exemplares de *B. soporator* (a) fêmea, com identificação de landmarks e (b) macho, com eixos das medidas de comprimento padrão e altura, utilizados nas análises morfométricas. Barra= 1 cm. **85**
- Figura 2.** Distribuição dos dados morfométricos de *B. soporator* ao longo da CV₁ e CV₂ para as populações do MA (□♂; ■♀), RN (○♂; ●♀), BA (△♂; ▲♀), SP (+♂; +♀) e SC (☆♂; ★♀). Símbolos maiores indicam a média morfométrica apresentada por machos (sem preenchimento) e fêmeas (com preenchimento). CV₁= 37,39% e CV₂= 20,75%, somadas correspondem a maior parte da variação da forma apresentada (58,15%). Nos boxes *warped outlines* gerados a partir da CV₁ entre machos (linha negra) e fêmeas (linha cinza) **90**

de cada população.

- Figura 3.** *Bathygobius soporator*. Regra de Rensch pela inspeção da regressão SMA com (a,b) o log da variável morfométrica de fêmeas (SL, H) pelo respectivo log da variável morfométrica dos machos (SL, H) e (c, d) pela regressão do log (SL, H) de fêmeas pelo respectivo SSD calculado. R^2 – Coeficiente de regressão RMA; pSMA – valor de probabilidade para a correlação entre as variáveis; b = coeficiente de angulação da reta estimada, pb – valor de probabilidade de isometria da reta estimada ($b=1$); linha preta – reta teórica com $b=1$; linha cinza – reta estimada pelo modelo RMA. 92

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Karyotypes of *C. boleosoma* (**a, b**) and *C. smaragdus* (**c, d**) after Giemsa staining (**a, c**) and C-banding (**b, d**). The AgNOR-carrying chromosomes are shown in boxes. sm= Submetacentric chromosomes; a= acrocentric chromosomes. Bar= 5 μ m. 110
- Figura 2.** Karyotypes of *C. boleosoma* (**a, b**) and *C. smaragdus* (**c, d**) after CMA₃/DAPI staining (**a, c**) and dualcolor FISH with 18S (red) and 5S (green) rDNA probes (**b, d**). Note the occurrence of GC-positive sites in the centromeric and terminal regions of most chromosomes in both species, as well as the significant increase of 5S rDNA sites in *C. smaragdus*. sm= Submetacentric chromosomes; a= acrocentric chromosomes. Bar= 5 μ m. 111

CAPÍTULO V

- Figura 1.** Female (top) and male (bottom) karyotypes of *Gobionellus oceanicus* arranged from Giemsa-stained (left) and C-banded (right) chromosomes. Sex chromosomes (XY) and Ag-NORs are highlighted in the boxes. Bar equals 5 μ m. 124
- Figura 2.** Female (top) and male (bottom) karyotypes of *Gobionellus stomatus* arranged from Giemsa-stained (left) and C-banding (right) chromosomes. Sex chromosomes (XY) and Ag-NORs are highlighted in the boxes. Bar equals 5 μ m. 125
- Figura 3.** Male karyotypes of *Gobionellus oceanicus* (left) and *Gobionellus stomatus* (right) arranged from chromosomes after FISH with 18S rDNA (red) and 5S rDNA probes (green) (top) and mapping with microsatellite (CA)₁₅ probes (bottom). A conspicuous 5S rDNA site is located on the short arm of the Y chromosomes of the species. Bar equals 5 μ m. 126

CAPÍTULO VI

- Figura 1.** Cariótipos de *C. glaucofraenum* e *E. lyricus* com coloração convencional com Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas os pares organizadores nucleolares exibindo sítios Ag-RONs e regiões CMA_3^+ /DAPI $^-$. Barra= 5 μm . **139**
- Figura 2.** Biplot da análise de componentes principais da relação entre valor diploide ($2n$) e número de braços cromossômicos (NF) com base na classificação das amostras para a distribuição das espécies de Gobiidae: Indo-Pacífico - linha roxa; Atlântico Ocidental - linha preta; Atlântico Oriental - linha azul; Pacífico Ocidental - linha vermelha. Linha tracejada representa a reta de tendência positiva (maior *loading*). **140**
- Figura 3.** Biplot da análise de componentes principais da relação entre valor diploide ($2n$) e número de braços cromossômicos (NF) a partir da classificação das amostras para as subfamílias de Gobiidae: Oxudercinae - linha roxa; Gobionellinae - linha preta; Gobiinae - linha azul; Amblyopinae - linha vermelha; Sicydiinae - ponto preto. A linha tracejada representa a reta de tendência positiva (maior *loading*). **140**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Collection sites of *Bathygobius soporator*. **39**

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Sequências do gene COI das espécies de *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1, e *Bathygobius* sp.2, e de outras espécies do Atlântico depositadas no GenBank. **64**
- Tabela 2.** Distâncias genéticas médias entre sequências COI de *Bathygobius* do Oceano Atlântico Ocidental baseado no modelo de substituição Kimura 2 parâmetros. **68**
- Tabela 3.** Distâncias de Mahalanobis (D^2) entre as espécies a partir da DFA (teste de permutação 10.000 rounds). **70**

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Estatística descritiva das variáveis morfométricas de machos e fêmeas das populações de *Bathygobius soporator* e valores de SSD (Standardized Size Dimorphism), calculado separadamente para comprimento padrão (SL) e altura do corpo (H). **88**
- Tabela 2.** Distância de Mahalanobis (D^2) entre os sexos e populações pela DFA, valor de $p<0.001$ (teste de permutação 10.000 rounds) para todos os dados. Em negrito, diferença intrapopulacional entre machos e fêmeas. **89**
- Tabela 3.** Distribuição dos dados morfométricos de *B. soporator* ao longo da CV1 e CV2 para as populações do MA ($\square\delta$; $\blacksquare\varphi$), RN ($\circ\delta$; $\bullet\varphi$), BA ($\Delta\delta$; $\blacktriangle\varphi$), SP ($\oplus\delta$; $\textcolor{red}{+}\varphi$) e SC ($\star\delta$; $\textcolor{red}{\star}\varphi$). Símbolos maiores indicam a média morfométrica apresentada por machos (sem preenchimento) e fêmeas (com preenchimento). CV1= 37,39% e CV2= 20,75%, somadas correspondem a maior parte da variação da forma apresentada (58,15%). Nos boxes warped outlines gerados a partir da CV1 entre machos (linha negra) e fêmeas (linha cinza) de cada população. **91**

CAPÍTULO VI

- Tabela 1.** Dados citogenéticos disponíveis para representantes da família Gobiidae. **141**

Resumo

A família Gobiidae é a mais diversificada no ambiente marinho. Tal diversidade foi acompanhada por alterações cromossômicas significativas, tornando um modelo biológico importante para estudos evolutivos. Em geral, apresenta ampla distribuição geográfica com características comportamentais e reprodutivas que a tornam propícia aos efeitos de barreiras biogeográficas ao fluxo gênico. Comparada a outros representantes da ordem Perciformes, apresenta características morfológicas reduzidas, com simplificações e perdas que dificultam estudos filogenéticos e tornam imprescindível a associação de novas metodologias para melhor entendimento dos processos ecológicos e evolutivos que garantiram tamanha diversificação. Dados citogenéticos para espécies presentes no litoral brasileiro são ínfimos. Os resultados aqui apresentados, abrangendo um maior espectro taxonômico e profundidade de análises, identificaram marcante diversidade cariotípica estrutural interespecífica para *Coryphopterus glaucofraenum*, *Bathygobius soporator*, *Bathygobius* sp.1, *Bathygobius* sp.2, *Ctenogobius smaragdus*, *Ctenogobius boleosoma*, *Gobionellus oceanicus*, *Gobionellus stomatus* e *Evorthodus lyricus*. Estas espécies analisadas fazem parte de uma fauna críptica pouco percebida e estudada, frequentemente impactada, mesmo por eventos locais estocásticos. Análises por morfometria geométrica indicaram variação significante na morfologia corporal de espécies do gênero *Bathygobius* e o reconhecimento de padrões de variação de forma corporal referentes ao sexo, com populações mais dimórficas em menores latitudes. Técnicas citogenéticas moleculares resolutivas aplicadas em estudos populacionais no litoral e em ilhas oceânicas identificaram diferenciações locais e reconheceram uma nova espécie para o gênero *Bathygobius*, residente no Atol das Rocas e Arquipélago de Fernando de Noronha. As análises ainda possibilitaram a descrição de um sistema XY de cromossomos sexuais nas duas espécies do gênero *Gobionellus* e a participação de elementos repetitivos na diferenciação deste sistema. Os dados aqui apresentados dão suporte ao alto grau de diversificação evolutiva da família, ampliam o conhecimento citogenético para o grupo, permitem identificar estruturações populacionais e respostas evolutivas das espécies às variações geográficas. Como modelo biológico, a família Gobiidae representa um contraponto evolutivo aos padrões genéticos mais conservativos vigentes entre espécies de grande vagilidade.

Palavras-chave: Evolução cromossômica. Estratificação populacional. Dimorfismo sexual. Cromossomos sexuais. Especiação.

Abstract

Gobiidae family is the most diversified in the marine environment, where such great diversity might be followed by significant chromosomal alterations, which makes it an important biological model. In general, the representatives of this family show a broad geographic distribution with behavioral and reproductive characteristics that make them propitious to the effect of biogeographical barriers. Compared to other representatives of the Perciformes Order, they present reduced morphological features, with simplifications and losses that difficult phylogenetic studies and make indispensable the association of new methodologies to a better understanding of the ecological and evolutionary processes related to such diversification. Cytogenetic data for existing species in the Brazilian coast are lowermost. The present results, enclosing a greater taxonomical spectrum and analytical profundity, identified a remarked interspecific structural diversity in the karyotype of *Coryphopterus glaucofraenum*, *Bathygobius soporator*, *Bathygobius* sp.1, *Bathygobius* sp.2, *Ctenogobius smaragdus*, *Ctenogobius boleosoma*, *Gobionellus oceanicus*, *Gobionellus stomatus* and *Evorthodus lyricus*. These species are part of a cryptic fauna poorly noted and studied, frequently impacted even for local stochastic events. Morphometric geometric analysis indicated significant variance in the body morphology among *Bathygobius* species and the recognition of body variation patterns related to the sex, when populations are found in lower latitudes. Resolutive molecular cytogenetical techniques applied in populational studies of coastal and oceanic islands identified local differentiations and recognized a new species for the *Bathygobius* genus, from Atol das Rocas and the archipelago of Fernando de Noronha. The analysis also allowed the description of an XY sex chromosome system in two *Gobionellus* species and the participation of repetitive elements in the differentiation of this sexual system. The present data give support to the high degree of evolutionary diversification in the family, improve the cytogenetical knowledge of this group, allow to identify populational stratification and evolutive responses to geographical variations. As a biological model, the family Gobiidae represents an evolutionary counterpoint to the more conservative genetic patterns prevailing among species with great vagility.

Keywords: Chromosomal evolution. Populational stratification. Sexual dimorphism. Sexual chromosomes. Speciation.

1. Introdução

Os peixes constituem um grupo polifilético com cerca de 28.000 espécies, o que corresponde a mais da metade das formas vivas de vertebrados. Deste total, cerca de 60% vive no ambiente marinho e a sua maioria habita as zonas costeiras (Nelson, 2006).

A ordem Perciformes, com 10.033 espécies, é a mais diversificada de todas as ordens de peixes, dominantes nos oceanos e em muitos ambientes dulcícolas tropicais e subtropicais. Particularmente, a subordem Gobioidei possui um número estimado de aproximadamente 2.211 espécies, distribuídas em 270 gêneros, correspondendo a aproximadamente 22% dos Perciformes (Pezold, 1984; Nelson, 2006).

Por sua vez, a família Gobiidae engloba 88% das espécies da subordem Gobioidei (Pezold, 1993), sendo considerada monofilética, com 210 gêneros e um número estimado de 1.950 espécies (Pezold, 1984; Tracker, 2003; Nelson, 2006). Gobiidae constitui a maior família de peixes marinhos (Robertson, 1998; Nelson, 2006), compartilhando características morfológicas, biológicas e comportamentais crípticas. Tal fato, aliado à grande quantidade de espécies e ao número insuficiente de informações biológicas, contribuem para a imprecisão em algumas caracterizações taxonômicas.

Anatomicamente, os Gobiidae apresentam suas nadadeiras pélvicas fusionadas formando um disco de succção que auxilia o animal em seu posicionamento no ambiente, além disso, exibem nadadeiras dorsais separadas, primeira nadadeira dorsal com espinhos e ausência de linha lateral (Nelson, 2006). A maior parte das espécies são bentônicas, vivendo em tocas ou esconderijos em ambientes marinhos e estuarinos. Contudo, alguns taxa exibem inúmeras adaptações ecológicas, como, por exemplo, formas nectônicas ou habilidade para respirar o oxigênio atmosférico (Robertson, 1998; Tracker, 2003).

Quanto aos aspectos biogeográficos, este grupo encontra-se amplamente distribuído, podendo ser encontrado ao longo dos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (Menezes & Figueiredo, 1985; Mendes, 2000; Tracker, 2003). Apresenta representantes em habitats estuarinos e dulcícolas, frequentemente sendo os mais abundantes em água doce no interior de ilhas oceânicas (Nelson, 2006). Estudos sugerem que esta extensa distribuição esteja ligada a fatores múltiplos, como, duração do período larval, padrão de correntes marinhas e a existência

de barreiras, que, provavelmente, contribuíram para alta variação genética observada no grupo (Muss *et al.*, 2001; Almada *et al.*, 2005).

Os Gobídeos representam elementos dominantes em habitats bentônicos nos recifes tropicais, podendo ser morfologicamente crípticos em relação aos membros da própria família ou de outras como Labrisomidae, Blenniidae (Bellwood & Wainwright, 2002) e Eleotridae (Galvão *et al.*, 2011). Seus hábitos alimentares são diversos, sendo em sua maioria carnívoros e onívoros, com alguns representantes herbívoros. Muitas espécies que vivem próximas à costa, alimentam-se principalmente de invertebrados bentônicos e algas. Em contraste a esta situação, espécies em habitats recifais podem apresentar hábitos alimentares mais especializados (Emmanuel & Ajibola, 2010).

É comum uma estreita associação entre diferentes espécies de gobídeos e outros animais, como esponjas, moreias, camarões e ouriços do mar. Pequenos gobídeos frequentemente são avistados associados a peixes maiores, alimentando-se de ectoparasitas e realizando a limpeza destes (Patzner *et al.*, 2012). Uma das associações popularmente conhecidas ocorre entre diferentes espécies de gobídeos bentônicos que compartilham uma toca, cavidade no substrato, com um camarão. O camarão constrói e mantém a toca, enquanto o gobídeo, com sua visão superior, serve como sentinela, sinalizando o perigo (Randall *et al.*, 2005).

A maior parte dos Gobídeos apresenta tamanho reduzido, não ultrapassando 10 centímetros (cm) de comprimento, seu maior representante, *Glossogobius giuris*, atinge cerca de 50 cm e o menor, *Trimmatom nanus*, com cerca de 8-10 milímetros, representando o menor vertebrado existente (Nelson, 2006). Apesar de pequenos, os gobídeos apresentam considerável importância ecológica e comercial. Sua elevada abundância em determinadas localidades os torna um componente importante na cadeia alimentar (Patzner *et al.*, 2012). Embora sejam pouco utilizadas na alimentação humana, algumas espécies são pescadas e comercializadas de forma significativa, como iscas na pesca de peixes comercialmente importantes, como bacalhau, robalo e arinca (Emmanuel & Ajibola, 2010).

Com cores exuberantes, comportamentos e tamanhos apropriados, muitas espécies despertaram o interesse de aquariofilistas, garantindo à família Gobiidae uma boa representatividade no mercado mundial de peixes ornamentais marinhos, compondo de 5 a 7 % das vendas (Wabnitz *et al.*, 2003). No Brasil, a espécie *Elacatinus figaro* já foi uma das mais importantes no comércio de exportação de peixes ornamentais

marinhos do país (Gasparini *et al.*, 2005), mas, atualmente, encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção, resguardadas do extrativismo (IBAMA, 2004).

1.1. Citogenética da família Gobiidae

Os peixes da ordem Perciformes apresentam tanto exemplos de conservação cromossômica, compartilhada por muitas espécies, quanto de diversificação cariotípica restrita a alguns grupos (Brum & Galetti, 1997), nos quais há polimorfismos cromossômicos numéricos e estruturais, além de vários sistemas sexuais (Galetti *et al.*, 2000). Apenas cerca de 5% das espécies de Perciformes foram cariotipadas (Molina *et al.*, 2014), deste total apenas 2% é composto por espécies marinhas (Molina & Bacurau, 2006).

As informações cromossômicas disponíveis em Perciformes marinhos têm demonstrado em grande parte cariótipos com $2n=48$, compostos quase que exclusivamente por cromossomos acrocêntricos (Molina *et al.*, 2014), sugerindo que a especiação, para alguns grupos, parece não ter sido seguida por diferenciação cariotípica significante (Motta-Neto *et al.*, 2011).

Ao contrário dos Perciformes, que apresentam marcante conservadorismo cromossômico (Brum & Galetti, 1997), a família Gobiidae destaca-se por apresentar grande diversidade cariotípica (Galetti *et al.*, 2000), com cariótipos variando de $2n=30$, em *Neogobius euricephalus* (Ene, 2003), a $2n=56$, em *Gobionellus microdon* (Uribe-Alcocer & Diaz-Jaimes, 1996).

Nas décadas de 70-90 a citogenética dos gobídeos concentrou-se nos continentes europeu e asiático (e.g. Arai & Sawada, 1975; Vitturi & Catalano, 1989; Klinkhardt, 1992; Caputo *et al.*, 1997; Arai, 2011), na maioria dos casos voltada à determinação de valores diploides e macroestrutura cariotípica (Caputo *et al.*, 1998). Apesar disto, os consistentes dados gerados permitiram identificar diferentes mecanismos envolvidos na diferenciação cariotípica deste peculiar grupo de peixes.

Os dados cromossômicos para a família Gobiidae estão disponíveis para 81 espécies (Galvão *et al.*, 2011). Os números diploides mais frequentes correspondem a $2n=44$ e 46, ambos com frequência aproximada de 35%, seguido por $2n=48$, com cerca de 9%. Acompanhado da diversificação numérica, identifica-se uma notável variação na macroestrutura cariotípica, caracterizada por valores para o número de braços cromossômicos (NF) de 38 a 98. O valor de $2n=46$ tem sido considerado basal para os Gobiidae, a partir do qual o aumento ou redução do número de cromossomos ou

presença de elementos bi-braquiais representariam cariotípos mais derivados (Vasil'ev & Grigoryan, 1993).

Esta diversidade cariotípica, está atribuída a diferentes mecanismos de rearranjos cromossômicos, que, quando relacionados à evolução, podem ser vantajosos, desvantajosos ou neutros. Caso seja vantajoso ou neutro, pode ser fixado na população e transmitido às progêneres, causando variações intrapopulacionais ou polimorfismos (Bezerra, 2002). Entre os principais mecanismos de diferenciação cromossômica evidenciados para a família Gobiidae, destaca-se os rearranjos Robertsonianos (Thode *et al.*, 1988; Amores *et al.*, 1990; Vasil'ev & Grigoryan, 1993; Caputo *et al.*, 1997; Galetti *et al.*, 2000; Ene, 2003).

A presença de variabilidade cariotípica intrapopulacional pôde ser constatada em algumas espécies de gobídeos como, por exemplo, *Aphia minuta* que apresentou cinco cariotípos/citótipos distintos em uma amostra de onze indivíduos presentes na costa de Ortona, Itália. Esta elevada variação cromossômica pode ser devido ao seu grande potencial de dispersão, pois se trata de uma espécie pelágica de ampla distribuição e alta vagilidade, o que pode promover um contínuo encontro de cariomorfos originados em diferentes zonas de abrangência geográfica da espécie, associado a uma tendência espontânea de ocorrência de fusão Robertsoniana (Caputo *et al.*, 1999).

Diversificações cariotípicas interpopulacionais são frequentes em espécies do gênero *Gobius*, como *G. niger* e *G. paganellus*, que incluem populações cariotipicamente monomórficas (Klinkhardt, 1992; Vasil'ev & Grigoryan, 1992; Caputo *et al.*, 1997) e populações com polimorfismo acentuado, envolvendo vários tipos de rearranjos cromossômicos (Vitturi & Catalano, 1989, Amores *et al.*, 1990, Caputo *et al.*, 1997).

No litoral brasileiro, onde são encontradas cerca de 40 espécies de Gobiidae (Menezes *et al.*, 2003), apenas uma tem seus dados citogenéticos conhecidos, *Bathygobius soporator* (Brum, 1996; Cipriano *et al.*, 2002). Este limitado contingente de informações citogenéticas para espécies presentes no litoral e ilhas oceânicas brasileiras vem impedindo seu uso em inferências sobre processos de diversificação cariotípica, estratificação populacional ou identificação de marcadores citotaxonomicos.

As modificações frequentes e complexas na estrutura cariotípica dos Gobídeos parecem estar ligadas ao padrão evolutivo deste grupo (Caputo *et al.*, 1997), tornando-o um importante objeto de estudo para melhor entendimento de mudanças visíveis na

macroestrutura cariotípica. Os estudos cromossômicos em gobídeos necessitam ser ainda amplamente intensificados, entretanto as análises ora realizadas em espécies do Atlântico Oeste vem contribuir substancialmente para o conhecimento da diversidade cariotípica e seus mecanismos regentes nesta região, o que, até então, era desconhecido.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar aspectos de diversificação na família Gobiidae em espécies do Atlântico, por meio de um amplo levantamento cariotípico, análises morfológicas e moleculares, a fim de realizar inferências filogenéticas e identificar os processos envolvidos na evolução deste peculiar grupo de peixes, considerado modelo evolutivo em função de sua baixa vagilidade.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar, a partir de análises citogenéticas, populações costeiras e insulares de *Bathygobius soporator* utilizando técnicas de bandamento cromossômico (Ag-RONs, Banda-C, fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI) e hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNA 18S, 5S e histona H1, procurando identificar marcadores populacionais efetivos e possíveis correlações filogenéticas (**Capítulo 1**);
- Estabelecer os padrões cariotípicos, morfológicos e comparar sequências de DNA mitocondrial (Citocromo Oxidase-I), de espécies presentes no litoral e ilhas oceânicas brasileiras do gênero *Bathygobius*, com seus correspondentes dispostos na América do Norte, América Central e Caribe (**Capítulo 2**);
- Investigar o dimorfismo sexual em diferentes populações brasileiras de *B. soporator* com fins de avaliar a variação morfológica intrapopulacional e interpopulacional entre os sexos e sua relação latitudinal, utilizando morfometria geométrica e tradicional (**Capítulo 3**);
- Averiguar os processos carioevolutivos entre espécies cogenéricas de *Ctenogobius* (*C. smaragdus* e *C. boleosoma*), a partir de técnicas de bandamento cromossômico (Ag-RONs, Banda-C, fluorocromos base-específicos) e hibridação *in situ* fluorescente (**Capítulo 4**);
- Investigar a distribuição de sequências repetitivas nos cariótipos de *Gobionellus oceanicus* e *Gobionellus stomatus*, com enfoque nos cromossomos sexuais,

diferenças estruturais e carioevolução do gênero (**Capítulo 5**);

- Caracterizar citogeneticamente as espécies *Coryphopterus glaucofraenum* e *Evorthodus lyricus* e analisar o padrão numérico e estrutural dos cariótipos disponíveis para os representantes da família Gobiidae (**Capítulo 6**).

3. Material e métodos

3.1 Material

Os exemplares da família Gobiidae foram coletados (Figura 01) ao longo do litoral brasileiro nos Estados do Rio Grande do Norte (RN), na praia de Búzios ($5^{\circ}41'57.41"S, 35^{\circ}11'34.71"O$) e Barra do Cunhaú ($6^{\circ}19'15.50"S, 35^{\circ}2'29.31"O$), Bahia (BA), na cidade de Salvador ($13^{\circ}0'39.61"S, 38^{\circ}31'27.21"O$), Maranhão (MA), na cidade de São Luís ($2^{\circ}28'14.06"S, 44^{\circ}15'49.15"O$), São Paulo (SP), na cidade do Guarujá ($23^{\circ}59'44.88"S, 46^{\circ}15'2.89"O$), Santa Catarina (SC), na cidade de Florianópolis ($27^{\circ}34'21.14"S, 48^{\circ}25'16.10"O$), além do Arquipélago de Fernando de Noronha (AFN) ($3^{\circ}50'20.24"S, 32^{\circ}24'51.13"O$) e Atol das Rocas (AR) ($3^{\circ}51"S, 33^{\circ}49O$), com o uso de redes e sacos plásticos.

No total, nove espécies da família Gobiidae foram analisadas no presente estudo (Figura 02), sendo elas: *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837), *Bathygobius* sp.1, *Bathygobius* sp.2 (presente no Atol das Rocas e Arquipélago de Ferando de Noronha), *Ctenogobius smaragdus* (Valenciennes, 1837), *Ctenogobius boleosoma* (Jordan & Gilbert, 1882), *Coryphopterus glaucofraenum* Gill, 1863, *Evorthodus lyricus* (Girard, 1858), *Gobionellus oceanicus* (Pallas, 1770) e *Gobionellus stomatus* Starks, 1913. Todas elas foram identificadas segundo Böhlke & Chaplin (1993).

Os espécimes utilizados para estudos morfológicos, citogenéticos e moleculares foram mantidos em aquários aerados até seu sacrifício por super dosagem do anestésico Eugenol, extraído do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*). Exemplares de cada espécie se encontram preservados em álcool 90% no Laboratório de Genética de Recursos Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

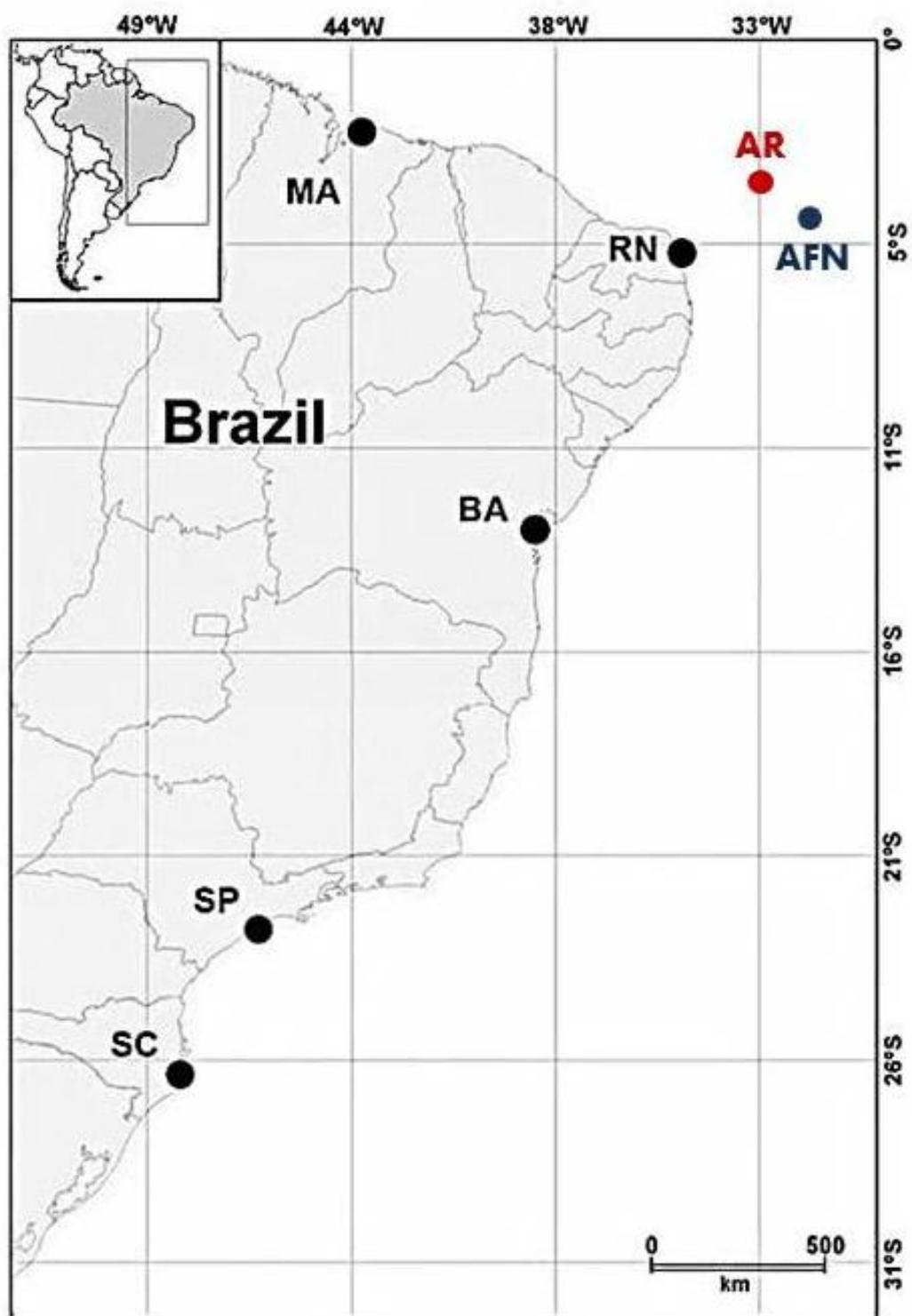


Figura 1. Mapa indicando os pontos do litoral e ilhas oceânicas brasileiras utilizados para coleta de Gobiidae.

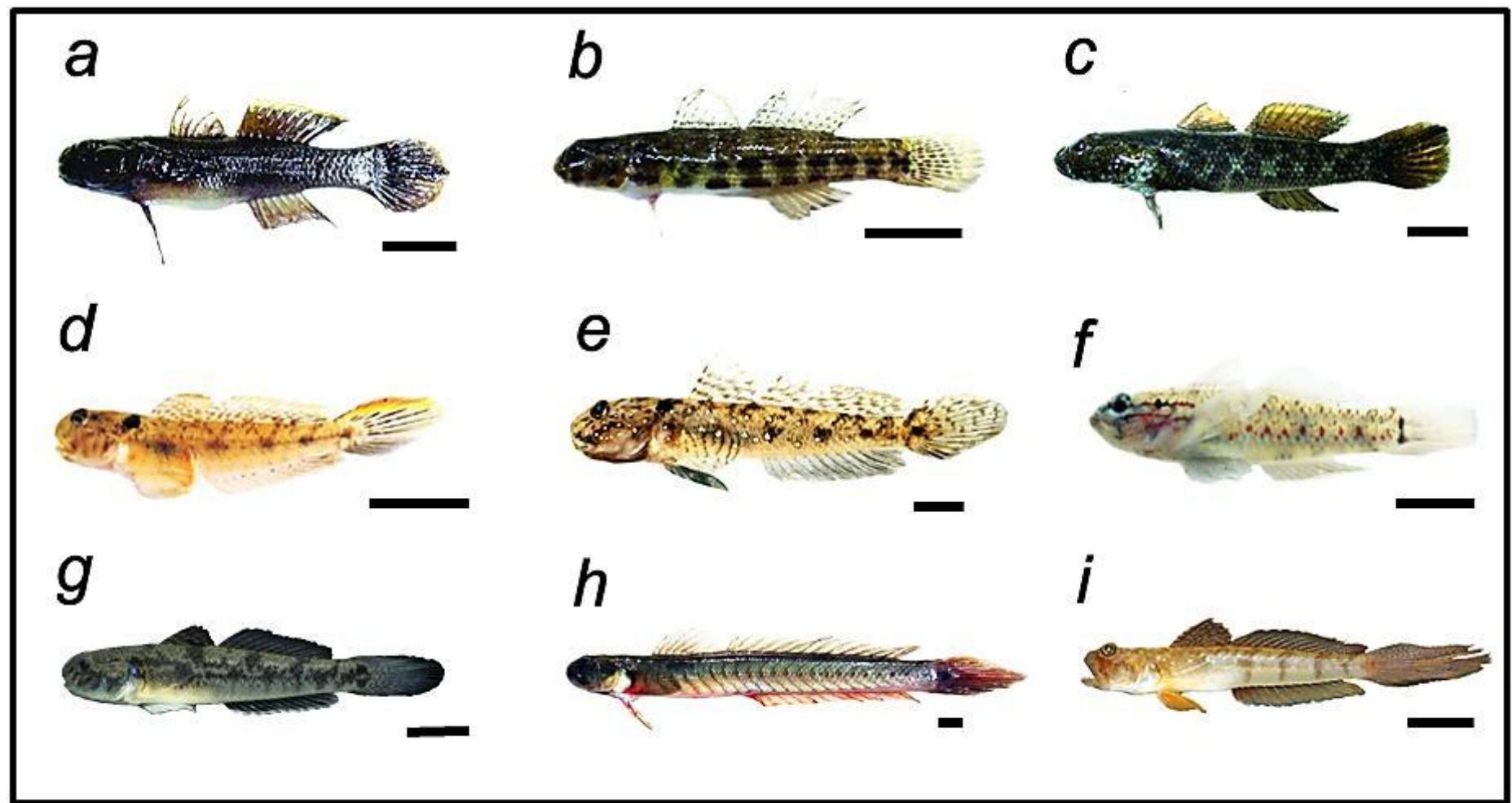


Figura 2. Exemplares da família Gobiidae utilizados nas análises citogenéticas. *Bathygobius soporator* (a), *Bathygobius mystacium* (b), *Bathygobius* sp (c), *Ctenogobius boleosoma* (d); *Ctenogobius smaragdus* (e), *Coryphopterus glaucofraenum* (f), *Evorthodus lyricus* (g), *Gobionellus oceanicus* (h) e *Gobionellus stomatus* (i). Barras=1cm.

3.2. Métodos

3.2.1. Técnica de estimulação mitótica

Para obtenção de metáfases, os exemplares foram estimulados mitoticamente através da técnica preconizada por Molina (2001), que faz uso de complexos comerciais de抗ígenos bacterianos e fúngicos, Munolan® (Allergan Frumtost) e Aminovac® (Molina *et al.*, 2010). Este procedimento consiste na inoculação intramuscular de solução do composto (2 comprimidos/1ml de água destilada); na proporção de 1ml/50g de peso corporal, por um período de 24 a 48 horas. Decorrido este tempo, os exemplares foram anestesiados e, posteriormente, sacrificados para extração do rim anterior.

3.2.2. Técnica de obtenção de cromossomos mitóticos

A técnica de obtenção de cromossomos mitóticos adotada seguiu o método de preparação *in vitro* descrito por Gold *et al.* (1990). Os exemplares tiveram o rim anterior e posterior removidos e utilizados para obtenção de suspensão celular. Estes foram colocados em 9ml de meio de cultura RPMI 1640 e dissociados com ajuda de seringas de vidro, transferindo o material logo em seguida para tubos de centrifuga de 15ml, completando o volume até 10ml. Foi adicionada solução de colchicina 0,025% para cessar a divisão mitótica deixando agir por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. Após o excedente ser removido, acrescentamos 9ml de solução hipotônica de KCl (0,075M), por 28 minutos em temperatura ambiente, ao término o material foi centrifugado por 10 minutos. Solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1 respectiva proporção) foi utilizada para fixação do material em três ciclos de centrifugação por 10 minutos, sendo o material conservado à -20°C em tubos de 1,5ml com tampa para preparação das lâminas e análises posteriores.

3.2.3. Preparação das lâminas

Um total de seis a oito gotas de suspensão celular foram gotejadas sobre uma lâmina recoberta com um filme d'água destilada aquecida à 60°C, após secar ao ar, foi corada com solução Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8 por um período de 8 minutos, posteriormente lavada com água destilada e seca ao ar.

3.2.4. Análises cromossômicas

Lâminas previamente preparadas com as suspensões celulares de cada indivíduo foram analisadas através de microscópio óptico, sob o aumento de 1000 vezes. Uma média de 30 metáfases foram analisadas para cada exemplar, visando ao estabelecimento do valor diploide modal para cada espécie e a definição dos padrões morfológicos cromossômicos. As metáfases, após análise, permitiram o estabelecimento dos valores diploides modais para cada espécie ou população. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio de epifluorescência (OlympusTM BX51), sob aumento de 1000 vezes, por meio de sistema digital de captura (câmera modelo DP73, Olympus), com o uso dos softwares DPController, v. 1.2.1.108 (Olympus Optical Co. Ltd.) ou CellSens (Olympus), e utilizadas na construção do cariótipo e definição da fórmula cromossômica. A montagem dos cariótipos deu-se pela ordenação dos cromossomos quanto à posição dos centrômeros em metacêntricos (m) com a razão entre o braço maior e menor (RB) variando de 1,00 a 1,70; submetacêntricos (sm), RB = 1,70 – 3,00; subtelocêntricos (st), RB = 3,00 – 7,00; e acrocêntricos (a), RB > 7,00 (Levan *et al.*, 1964).

3.2.5. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram evidenciadas de acordo com as técnicas descritas por Howell e Black (1980). Previamente, foi preparada uma solução gelatinosa contendo 1g de gelatina incolor acrescido de 50ml de água e 0,5ml de ácido fórmico. A solução foi depositada na lâmina, misturada a quatro gotas de nitrato de prata (Ag-NO_3) 50%, cobrindo-a em seguida com lamínula. Logo após, foi incubada em estufa a 70°C entre cinto a oito minutos, até o surgimento de coloração âmbar. Ao término do processo, a lâmina foi lavada com água destilada, seca ao ar e analisada ao microscópio.

3.2.6. Detecção de Heterocromatina Constitutiva (Banda-C)

A observação de regiões de heterocromatina constitutiva foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Summer (1972) com pequenas alterações, visando a uma melhor qualidade das preparações. Inicialmente, as lâminas foram imersas em HCl 0,2N à temperatura ambiente, por 14 minutos, lavando-as em seguida em água destilada e secas ao ar. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas numa solução

$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ a 5% durante um período de 1 a 2 minutos a 42°C. Após incubação, foram expostas à HCl 0,2N rapidamente, lavadas com água destilada e mantidas em solução de 2 x SSC a 60°C por cerca de uma hora, sendo, posteriormente, coradas com solução Giemsa (1% em tampão fosfato, pH 6,8) e visualizadas ao microscópio.

3.2.7. Coloração com Fluorocromos base-específicos

Para a dupla coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, as lâminas foram envelhecidas por três dias, coradas com 10µL de CMA₃ 0,5 mg/ml por 30 minutos e, em seguida, coradas com 10µl de DAPI 2µL/mL por 60 minutos (Carvalho *et al.*, 2005), com modificações. As lâminas foram montadas em tampão glicerol-McIlvaine pH 7,0 (1:1), preservadas em câmara escura, por três dias, e então analisadas. As metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio de epifluorescência com filtros apropriados (OlympusTM BX51) em aumento de 1000 vezes por meio de um sistema digital de captura (câmera Olympus modelo DP73), com o uso dos software DPController, v. 1.2.1.108 (Olympus Optical Co. Ltd.) ou CellSens (Olympus).

3.2.8. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) – Sondas 18S, 5S, Histona H1, Microssatélite (CA)₁₅

Três famílias multigênicas (RNAr 5S, RNAr 18S e H1 DNAhist) foram isoladas do genoma de *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes) e utilizadas como sondas. A primeira sonda continha uma cópia de repetição de rDNA 5S e incluía 120 pares de bases (pb) do gene que codifica o rRNA 5S e 200 pb de *non-transcribed spacer* (NTS) (Martins *et al.*, 2006). A segunda sonda corresponde a um segmento de 1400 pb do gene 18S rRNA obtido através de PCR a partir de DNA nuclear (Cioffi *et al.*, 2009), enquanto a terceira é um gene de histona H1, obtido a partir do DNA nuclear por PCR, de acordo com Hashimoto *et al.* (2011). As duas primeiras sondas foram marcadas com dig-11-dUTP e a última com biotina-14-dATP (Bionick Labelling System, Roche, Mannheim, Alemanha).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. As sondas foram marcadas por *nick translation* (BioNick Labeling System – Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A solução de hibridação consistiu de 200µl de formamida 50%, 80µl de sulfato dextrano 50%, 40µl de 20xSSC, 80µl de água q.s.p.,

perfazendo um volume total de 400 μ l, sendo adicionado 1,5 μ g de sonda (DNA marcado com biotina). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico. As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram lavadas com tampão PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente, sob agitação e, posteriormente, desidratadas em série alcoólica (70%, 85% e 100%). Em seguida, foram submetidas à digestão com RNase (100 μ g/ml) por 1 hora e 30 minutos, em câmara úmida a 37°C, e lavadas em soluções salinas. O material foi desidratado em uma série alcoólica, 5 minutos em cada banho, e tratado com formamida 70%/2xSSC a 70°C, por 5 minutos, para desnaturação dos cromossomos. Uma nova desidratação em série alcoólica foi realizada. Após tal procedimento, foi aplicado, sobre a lâmina, 50 μ l da solução de hibridação contendo a sonda desnaturada, permanecendo em câmara úmida overnight a 37°C. Transcorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em solução de formamida 50%/2xSSC a 42°C por 10 minutos, três vezes em 0,1xSSC a 60°C, 5 minutos em cada lavagem e em solução Tween 20 (0,05%/2xSSC), sob agitação, por 5 minutos. Em seguida, foi realizado um tratamento com 90 μ l de NFDM 5% (*non fat dry milk* – leite em pó desnatado) em 4xSSC, por 15 minutos à temperatura ambiente. A detecção da sonda foi realizada depositando, sobre as lâminas, 70 μ l de FITC (fluoresceína isotil cianato-avidina conjugada) a 0,25 μ g/ μ l, por 30 minutos, em câmara úmida, com três lavagens sucessivas de 5 minutos com Tween 20. Os sinais de hibridação foram amplificados através da deposição de 70 μ l de anti-avidina biotina-conjugada, por 30 minutos, com três lavagens adicionais de 5 minutos com Tween 20. Este ciclo e o tratamento com FITC foi repetido mais uma vez. Finalizado, a lâmina foi desidratada em série alcoólica (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos em cada banho. Os sinais de hibridação foram detectados com avidina-FITC e os cromossomos contra-corados com iodeto de propídio (50 μ g/ml) ou DAPI (0,2 μ g/ml).

Sequências (CA)₁₅ oligonucleótidos foram marcadas diretamente com Cy3 durante a síntese. A sonda desnaturada foi aplicada à lâmina, coberta com uma lamínula, permanecendo por 18 horas a 37°C. As lâminas foram então lavadas à temperatura ambiente, duas vezes durante 5 minutos cada, em 2xSSC e uma vez durante 1 minuto em 1XPBS.

3.2.9. Análise do DNA mitocondrial - Citocromo Oxidase-I

Fragmentos de tecido muscular e/ou fígado foram retirados dos exemplares, acondicionados em microtubos (1,5mL) contendo álcool etílico 100% e armazenados à temperatura de -20°C. O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram maceradas após imersão em nitrogênio líquido, homogeneizadas em tampão de extração adicionado de Proteinase K. O DNA foi extraído com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com NaCl 5M e isopropanol 100% gelado, recebendo ainda uma lavagem com etanol 70% gelado para retirada do excesso de sal e dissolvido com água ultrapura. Após a extração o DNA foi quantificado a partir de comparação visual com auxílio do marcador 100pb em gel de agarose 0,8%. A corrida eletroforética teve duração de aproximadamente 15 minutos de migração sob voltagem de 40 volts, sendo gel corado com GelRedTM e observado com o auxílio do trans-iluminador de luz ultravioleta.

Para a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), 1μl de DNA total foi usado em uma reação de 10μl com 0,5U Bioline (Bio-Line USA, Boston, Massachusetts) Taq polimerase, 0,4μl 50mM MgCl₂, 1μl 10 × buffer, 0,5μl 10mM desoxiribonucleotideo trifosfato (dNTP), e 0,3μl de 10μM de cada primer FISH-BCL (5'-TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC-3') e FISH - BCH (5'-TAA ACTT CAG GGT GAC CAA AAA ATC A-3'). Foi utilizada a seguinte programação para o termociclador: uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos. Por fim, foi realizada uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após esta etapa, o produto da PCR foi purificado com a enzima ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH) seguindo o protocolo do fabricante.

Posteriormente, as amostras seguiram para a reação de sequenciamento do DNA, realizada pela empresa ACTGene Análises Moleculares, utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram visualizadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 1999). Posteriormente, as sequências foram alinhadas de forma múltipla no ClustalW (Thompson *et al.*, 1997).

Com base em Tornabene *et al.* (2010), as análises das sequências foram realizadas no programa MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2008). O modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P) foi utilizado para as análises inter e intraespecíficas (Kimura, 1980). O modelo de K2P considera a diferença relativa entre

as sequências comparadas par a par, levando em consideração que as taxas de transição e transversão são diferentes, mas assumem frequências de bases iguais (Schneider, 2007).

A representação da distância genética entre as espécies foi estabelecida com base no método de *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987). O método de *neighbour-joining* é uma versão simplificada do método da evolução mínima, onde a construção da árvore começa em forma de estrela e, posteriormente, os táxons mais estreitamente relacionados, ou seja, vizinhos passam a ser considerados como um único táxon (Nei & Kumar, 2000). Tal método de análise tem sido eficiente para o estudo das relações entre espécies utilizando o gene citocromo c subunidade I (COI) *barcoding* (e.g. Nei & Kumar, 2000; Barrett & Hebert, 2005; Rivera & Currie, 2009). O enraizamento foi feito pelo método de comparação com grupos externos de Nixon e Carpenter (1993).

3.3. Análises por Morfometria Geométrica

Para a análise da variação morfológica corporal, imagens no formato JPEG, com dimensão 3264x2448, foram obtidas da face lateral esquerda dos espécimes, com escala métrica referenciada, utilizando-se uma câmera digital Sony H10 (8,1 megapixels) acoplada a um tripé VF WT3540.

O programa tpsUtil ordenou as imagens dos espécimes num único arquivo com o formato TPS, possibilitando seu acesso pelo software tpsDig2 (Rohlf, 2006), utilizado para localizar os marcos anatômicos ou *landmarks* nas imagens, escolhidos segundo a classificação de Bookstein (1991). As coordenadas do *landmarks* foram submetidas a *Generalized Procrustes analysis* (GPA) (Dryden & Mardia, 1998) no MorphoJ 1.02b ® (Klingenberg, 2011). Esta análise minimiza a variação da forma entre indivíduos causada pelo tamanho, posição e rotação. Análise de variáveis canônicas (CVA), análise de variância multivariada (MANOVA) e análise de função discriminante (DFA), onde a distância de Mahalanobis (D^2) ou de Procrustes (Proc) gerada possibilita a mensuração da variação da forma corporal entre os grupos estudados.

A partir da variável canônica de maior influência na variação morfológica, foi obtido *warped outlines* para identificar, com maior clareza, as variações vetoriais dos *grides* de deformação comparativos entre os grupos estudados.

4. Referências

- Almada, F., Alamada, V. C., Guillemaud, T., Wirtz, P. 2005. Phylogenetic relationships of the north-eastern Atlantic and Mediterranean blenniids. Biological Journal of the Linnean Society 86: 283-295.
- Almeida-Toledo, L. F., Coutinho-Barbosa, A. C., Rosenberg, C., Daniel, M. F. Z., Toledo-Filho, S. A. 1993. Hibridação *in situ* com sondas de rDNA em cromossomos de *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* e de seus híbridos. Brazilian Journal of Genetics, 16: 141p.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G. 1990. Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). Heredity 65: 151-155.
- Arai, R. 2011. Fish karyotypes A Check List. Springer, Japan.
- Arai, R., Sawada, Y. 1975. Chromosomes of Japanese gobioid fishes (III). Bulletin National Science Museum Tokyo 1: 225–232.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. Canadian Journal of Zoology 83: 481-491.
- Bellwood, D. R., Wainwright, P. C. 2002. The history and biogeography of fishes on coral reefs. Pp. 5-32 in: P. F. Sale, ed. Coral reef fishes. Academic Press, San Diego, CA.
- Bezerra, D. D. 2002. Estudos citogenéticos populacionais em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces – Erythrinidae). Análise da biodiversidade. Dissertação de Mestrado em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos – São Carlos.
- Böhlke, J. E., Chaplin, C. C. G. 1993. Fishes of the Bahamas and adjacent tropical waters. 2nd edition. University of Texas Press, Austin.
- Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 435p.
- Brum, M. J. I. 1996. Cytogenetic Studies of Brazilian Marine Fish. Brazilian Journal of Genetics 19: 421-427.
- Brum, M. J. I., Corrêa, M. M. O., Purcell, C. A., Ribeiro, V. P., Muratori, R. S. 1996. Análise cromossômica em *Xenomelaniris brasiliensis* (Atherinidae), *Micropogonias furnieri* (Scianidae) e *Bathygobius soporator* (Gobiidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro. In: VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e aplicada de Peixes Neotropicais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 101.
- Brum, M. J. I., Galetti-Jr., P. M. 1997. Teleostei plan ground karyotype. Journal of Computational Biology 2: 91-102.
- Caputo, V., Caniglia, M. L., Machella, N. 1999. The chromosomal complement of *Aphia minuta*, a paedomorphic goby. Journal of Fish Biology 55: 455-458.

- Caputo, V., M. Sorice, R. Vitturi, H. Magistrelli, Olmo, E. 1998. Cytogenetic studies in some species of Scorpaeniformes (Teleostei: Percomorpha). Chromosome Research 6: 255-262.
- Caputo, V., Marchegiani, F., Sorice M., Olmo, E. 1997. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). Cytogenetics and Cell Genetics 79: 266-271.
- Carvalho, R., Soares-Filho, W. S., Brasileiro-Vidal, A. C., Guerra, M. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: A chromosomal comparison. Cytogenetic Genome Research 109: 276-282.
- 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: 34p.
- Cipriano, R. R. Cestari, M. M. Fenocchio, A. S. 2002. Levantamento citogenético de peixes marinhos do litoral do Paraná. In: Simpósio de citogenética e genética de peixes, IX, Maringá – PR. Resumos. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 111p.
- Dryden, I. L., Mardia, K. V. 1998. Statistical shape analysis. John Wiley & Sons, New York.
- Emmanuel, O. L., Ajibola, E. T. 2010. Food and feeding habits and reproduction in Frillfin goby, *Bathygobius soporator* (Cuvier and Valenciennes, 1837) in the Badagry Creek, Lagos, Nigeria. International Journal of Biodiversity and Conservation 2: 414-421.
- Ene, A. C. 2003. Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). Marine Biology 142: 583-588.
- Galetti-Jr., P. M., Aguilar, C. T., Molina, W. F. 2000. An overview on marine fish cytogenetics. Hydrobiologia 420: 55-62.
- Galetti-Jr., P. M., Molina, W. F., Affonso, P. R. A. M., Aguilar, C. T. 2006. Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. Genetica 126: 161-177.
- Galvão, T. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2011. Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). Comparative Cytogenetics 5: 259-275.
- Gasparini, J. L., Floeter, S. R., Ferreira, C. E. L. Sazima, I. 2005. Marine Ornamental Trade in Brazil. Biodiversity and Conservation 14: 2883-2899.
- Gold, J. R., Li, 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.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

- Hashimoto, D. T., Ferguson-Smith, M. A., Rens, W., Foresti, F., Porto-Foresti, F. 2011. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research* 134: 64-71.
- Howell, W. M., Black, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- IBAMA. 2004. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução normativa n 5, de 21 de maio de 2004. 10p.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Klinkhardt, M. B. 1992. Chromosome structures of four Norwegian gobies (Gobiidae, Teleostei) and a hypothetical model of their karyo-evolution. *Chromatin* 3: 169-183.
- Klinkhardt, M. B., Tesche, M., Greven, H. 1995. Database of fish chromosomes. Westarp Wissenschaften, Magdeburg, Germany. 273pp.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Levan, A., Fredga, K., Sandeberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Martins, C., Ferreira, I. A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti-Jr., P. M. 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141.
- Mendes, L. F. 2000. História natural, biologia alimentar, repartição espacial, densidades populacionais e ecomorfologia de Gobioides e Blenioides (Perciformes) do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE. Tese de Doutorado, USP, SP, Brasil.
- Menezes, N. A., Buckup, P. A., Figueiredo, J. L., Moura, R. L. 2003. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 160p.
- Menezes, N. A., Figueiredo, J. L. 1985. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 105p.
- Molina, W. F. 2001. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science* 5: 149-152.
- Molina, W. F., Alves, D. E. O., Araújo, W. C., Martinez, P. A., Silva, M. F. M., Costa, G. W. W. F. 2010. Performance of human immunostimulating agents in the

- improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* 9: 1807-1814.
- Molina, W. F., Bacurau, T. O. F. 2006. Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia* 71: 237-242.
- 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.
- Muss, A., Robertson, D. R., Stepien C. A., Wirtz, P., Bowen, B. W. 2001. Phylogeography of *Ophioblennius*: The role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55: 561-572.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, 333pp.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Nixon, C. K., Carpenter, J. M. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Patzner, R. A., Tassell, J. L. V., Kovacic, M., Kapoor, B. G. 2012. The Biology of Gobies, CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 13: 978-1-4398-6233-9.
- Pezold, F. 1984. Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldti* (Pisces: Gobiidae). *Copeia* 1984: 235-238.
- Pezold, F. 1993. Evidence for a monophyletic Gobiidae. *Copeia* 1993: 634-643.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 2934-2938.
- Randall, J. E., Lobel, P. S., Kennedy, C. W. 2005. Comparative ecology of the gobies *Nes longus* and *Ctenogobius saepepallens*, both symbiotic with the snapping shrimp *Alpheus floridanus*. *Environmental Biology of Fishes* 74: 119-127.
- Rivera, J., Currie, D. C. 2009. Identification of Nearctic Black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology* 9: 224-236.
- Robertson, D. R. 1998. Do coral-reef fish faunas have a distinctive taxonomic structure? *Coral Reefs* 17: 179-186.
- Rohlf, F. J. 2006. tpsDig version 2.10. Ecology and Evolution, Suny at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Could Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schneider, H. 2007. Métodos de análise filogenética: um guia prático. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. 200pp.

- Summer, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Thode, G., Martinez, G., Ruiz, J. L. Lopez, J. R. 1988. Complex chromosomal polymorphism in *Gobius fallax* (Gobiidae, Perciformes). *Genetica* 76: 65-71.
- Thompson, J. D. Gibson, T. J. Plewniak, F. Jeanmougin, F. Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Tornabene, L. Baldwin, C. Weight, L.A. Pezold, F. 2010. Exploring the diversity of western Atlantic *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae) with cytochrome c oxidase-I with descriptions of two new species. *Aqua, International Journal of Ichthyology* 16: 141-170.
- Tracker, C. E. 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 354-368.
- Uribe-Alcocer, M., Diaz-Jaimes, P. 1996. Chromosome complements of *Gobionellus microdon* and *Eleotris picta* collected in Mexico. *Journal of Fish Biology* 48: 796-798.
- Vasil'ev V. P., Grigoryan K. A. 1993. Karyology of the Gobiidae. *Journal of Ichthyology* 33: 1-16.
- Vasil'ev, V. P., Grigoryan, K. A. 1992. Karyology of fishes from the family Gobiidae. *Voprosy Ikhtiolozii* 32: 27-40.
- Vitturi, R., Catalano, E. 1989. Multiple chromosome polymorphism in the gobiid *Gobius niger jozo* L. 1758 (Pisces, Gobiidae). *Cytologia* 54: 231-235.
- Wabnitz, C., Taylo, M., Green, E., Razak, T. 2003. From ocean to aquarium. UNEP-WCMC, Cambridge, UK. 66p.

Capítulo 1

Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes)

Paulo Augusto Lima-Filho¹, Marcelo de Bello Cioffi², Luiz Antônio Carlos Bertollo², Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

Artigo publicado na revista Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 43: 63–70 (2012). DOI:10.1016/j.jembe.2012.08.004

Abstract

Evidence of population fragmentation and speciation processes has been reported for several species of marine fish, including small cryptobenthic forms of Atlantic. Four populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator*, which cover a wide geographical area of the Atlantic coast in North/Northeast Brazil, were cytogenetically analyzed and their morphological patterns compared. Continental populations of this species (denominated MA, RN, and BA) exhibited divergences in morphological and chromosomal characteristics compatible with interpopulation differentiation. However, specimens from Rocas Atoll (RA) displayed notable divergences in these parameters, corroborating molecular data that suggest they are a different species. Furthermore, the RN population showed intrinsic chromosomal markers, revealing a certain level of population structuring. Chromosomal and morphological patterns found confirm the biodiversity of *B. soporator*, substantiating an evolutionary scenario of population divergences and adaptation to new habitats.

Keywords: Chromosomal evolution. Geometric morphometrics. H1 genes. Molecular cytogenetics. Population divergences.

1. Introduction

The family Gobiidae, composed of around 1950 small species found in tropical and subtropical waters has the highest diversity among marine fish species (Nelson, 2006). Some of these display broad geographical distribution, in habiting the Western Atlantic from Florida to Rio Grande do Sul state in southern Brazil (Burns et al., 2010; Robins and Ray, 1986) and the Eastern Atlantic from Senegal to Angola (Afonso et al., 1999).

Despite its amphi-Atlantic distribution, the frillfin goby, *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837), exhibits limited movement and is characterized as a sedentary benthic species (Fanta, 1997). As coastal dwellers, these fishes can be found in tide pools within the intertidal zone of coastal regions and oceanic islands, displaying remarkable homing behavior (Gibson and Yoshiyama, 1999).

Species with wide geographic distribution are typically subdivided by biogeographical barriers and may exhibit different levels of gene flow, either as migrating adults or through the free-swimming larval phase. Dispersion rates and population connectivity are generally influenced by ocean currents (Imron et al., 2007), resulting in interdependent genetic evolution processes (Luttikhuizen, 2003). Assuch, the limited movement of *B. soporator*, associated with the presence of adhesive eggs, short pelagic larval period (Peters, 1983; Tavolga, 1953), and particular characteristics of their local environment, casts doubt on their ability to maintain effective interpopulational genetic flow, and, consequently, any possible speciation process. Given the favorable conditions for population fractionation, one cannot rule out the possibility that *B. soporator* may be a complex species, like many other marine species with wide geographic distribution which, under detailed examination, are composed of morphologically similar, but genetically distinct groups (Knowlton, 2000).

The high karyotypic diversity of Gobiidae (Galetti et al., 2000) appears to be associated with speciation processes (Mandrioli et al., 2001). Thus, in order to establish structural aspects of karyotypes in Atlantic Gobiidae and investigate possible evidence of chromosomal divergences among populations of *B. soporator*, detailed karyotype analyses were conducted. These involved cytogenetic mapping of three multigene families and comparative analysis of body patterns by geometric morphometrics (GM) in populations geographically distributed along the Brazilian coast and on Rocas Atoll, in the Western Atlantic.

2. Material and methods

2.1. Specimens and chromosomal preparation

The four populations analyzed here, denominated MA (São Luís, Maranhão), BA (Salvador, Bahia), RN (Nísia Floresta, Rio Grande do Norte), and RA (Rocas Atoll) are specified in Fig. 1 and Table 1.

Specimens were submitted to in vivo mitotic stimulation for a period of 24–48 h through intramuscular injection of complex bacterial and fungal antigens (Molina et al., 2010). Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions of the anterior portion of the kidneys (Gold et al., 1990). Approximately thirty metaphases were analyzed for each specimen in order to establish the modal diploid number. The best metaphases were photographed on an Olympus™ BX51 microscope, coupled to an Olympus DP73 digital camera, and used to construct the karyotype. Chromosome morphology was determined according to Levan et al. (1964). The chromosomes were arranged in the karyotype in descending order of size.

Heterochromatic regions were assessed by C-banding (Sumner, 1972). Chromosomes were stained with CMA₃ and DAPI fluorochromes (Carvalho et al., 2005) and Ag-NOR sites identified according to Howell and Black (1980).

Table 1. Collection sites of *Bathygobius soporator*.

Location	Population	m	f
São Luís (MA) – Araçagi Beach	MA	5	9
Salvador (BA) – Farol da Barra Beach	BA	11	9
Nísia Floresta (RN) – Búzios Beach	RN	10	10
Rocas Atoll	RA	4	6

m and f = number of males and females cytogenetically analyzed, respectively; MA = Maranhão, BA = Bahia, and RN = Rio Grande do Norte Brazilian States; RA = Rocas Atoll.

2.2. Probes for chromosome hybridization

Three multigene families (5S rRNA, 18S rRNA and H1 hisDNA) were isolated from the *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes) genome and used as probes. The first probe contained a 5S rDNA repeat copy and included 120 base pairs (bp) of

the 5S rRNA encoding gene and 200 bp of the non-transcribed spacer (NTS) (Martins et al., 2006). The second probe corresponded to a 1400 bp segment of the 18S rRNA gene obtained via PCR from nuclear DNA (Cioffi et al., 2009), while the third was an H1 Histone gene, obtained from nuclear DNA by PCR, according to Hashimoto et al. (2011). The 18S rDNA, H1 hisDNA and 5S rDNA probes were labeled by nick translation according to manufacturer specifications. The first two were labeled with dig-11-dUTP and the last with biotin-14-dATP (Bionick Labelling System, Roche, Mannheim, Germany).

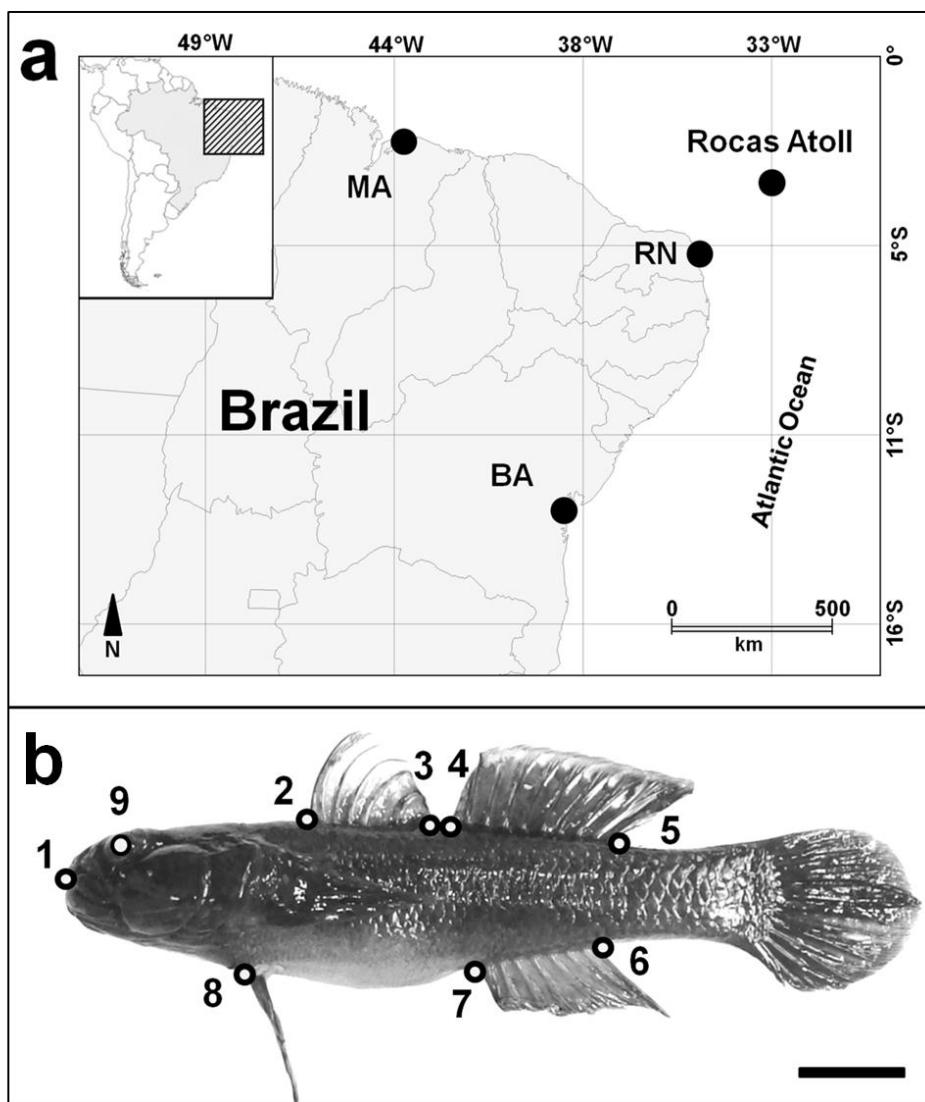


Fig. 1. Collection sites for *B. soporator* along the Brazilian coast and Rocas Atoll sample (a); *B. soporator* specimen with the nine landmarks used for interpopulation morphological analysis (b). Schematic description of landmarks: 1. Distal extremity of the premaxillary bone; 2. Start of the first dorsal fin; 3. End of the first distal fin; 4. Start of the second dorsal fin; 5. End of the second dorsal fin; 6. End of the anal fin; 7. Start of the anal fin; 8. Start of the pelvic fin; 9. Medial position of the eye. Bar=1.5 cm.

2.3. Chromosome hybridization

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed on mitotic chromosome spreads (Pinkel et al., 1986). First, a double-FISH analysis was conducted using 5S rDNA and H1 hisDNA as probes. The slides were then dismounted and sequentially hybridized with the 18S rDNA probe. Metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 μ g/ml) for 1.5 h at 37°C. After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide, spreads were incubated in 2 \times SSC for 4 min at 70°C. Hybridization mixtures containing 100ng of denatured probe, 10mg/ml dextran sulfate, 2 \times SSC and 50% formamide in a final volume of 30 μ l, were dropped on to the slides and hybridization was carried out overnight at 37°C in a 2 \times SSC moist chamber. Post-hybridization washes were performed at 37°C in 2 \times SSC and 50% formamide for 15 min, followed by a second 15-minute wash in 2 \times SSC and a final wash at room temperature in 4 \times SSC for the same amount of time. Signal detection was conducted using avidin-FITC (Sigma®, St Louis, MO, USA) for the 5S rDNA probe and anti-digoxigenin-rhodamine (Roche, Mannheim, Germany) for 18S rDNA and H1 hisDNA probes. The post-hybridization washes were performed on a shaker (150 rpm). Chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μ g/ml). FISH analysis was carried out with an epifluorescence microscope (Olympus BX51) and metaphase plates were captured by a CoolSNAP system software, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics).

2.4. Morphometric analyses

Geometric morphometrics analyses used adult specimens from Maranhão (n=50), Rio Grande do Norte (n=50), Bahia (n=50), and the Rocas Atoll (n=20) (Fig. 1a). Standardized images of the left side of each specimen (Fig. 1b) were captured with a Sony H10 (8.1 megapixels) digital camera mounted on a VF WT3540 tripod.

Nine landmarks were selected for comparative analysis between morphotypes (Fig. 1b), using tpsDig2 software, version 1.40 (Rohlf, 2006), in order to obtain an adequate profile of the side of the body. Spatial positioning coordinates for each landmark were superimposed using CoordGen6 software. Landmark configurations for the body were overlapped based on generalized procrustes alignment (Dryden and Mardia, 1998; Rohlf and Slice, 1990). Canonical variate analyses (CV) and MANOVA, developed with CVAGen6 software, enabled morphometric comparisons and jackknife testing for group allocation. Discriminant analyses and comparative outline drawings

based on shape deformation were created with the MorphoJ 1.02b program (Klingenberg, 2011).

3. Results

3.1. Chromosomal patterns of continental populations

Cytogenetic analysis revealed two distinct karyotype patterns. *B. soporator* populations from the Brazilian coast (MA, RN and BA) exhibited $2n=48$ chromosomes ($FN=56$) and karyotype formula consisting of $2m+6st+40a$ (Fig. 2). Ag-NOR sites in these samples are located in the terminal position on the short arm of subtelocentric pair 4. FISH with 18S rDNA probes indicated that the major ribosomal regions are unique and consistent with Ag-NOR sites (Fig. 2, highlighted). These regions are shown to be heterochromatic, displaying a strong $CMA3^+/DAPI^-$ response. C-banding demonstrated heterochromatic segments in the centromeric regions of most chromosomes and the terminal areas of others, extending along the short arms of subtelocentric chromosomes. Sequences of the 5S ribosomal subunit are located on the long arm of subtelocentric pair 2 in MA and BA populations, while in the RN population they are also found on the terminal portion of the long arm of pair 10 (Fig. 3). In the three continental populations, gene mapping of histone H1 (hisDNA) revealed multiple sites in the centromeric position of chromosome pairs 2 and 13 (Fig. 3). In pair 2, these genes were mapped in synteny with 5S rDNA sites (terminal position of the long arm).

3.2. Chromosomal patterns of specimens from Rocas Atoll

Specimens from the RA population displayed $2n=48$ chromosomes, with a karyotype of $28st+20a$ ($NF=76$), profoundly different from continental populations. Ag-NOR sites are located in the terminal position on the short arm of subtelocentric pair 13. These sites were heterochromatic and rich in GC bases ($CMA3^+/DAPI^-$). Conspicuous heterochromatic blocks were distributed in the centromeric position of most chromosomes, more evident on the short arms of subtelocentric chromosomes. Mapping of 5S rDNA ribosomal sequences and H1 histone with double-FISH revealed the presence of multiple sites for both genes (Fig. 3). Signs of 5S sequences were mapped in the terminal portion of the long arms in pairs 3 and 20. Histone H1 genes were located in the centromeric position of 3 pair (in synteny with the 5S sites on the long arms of this pair), as well as on pair 6.

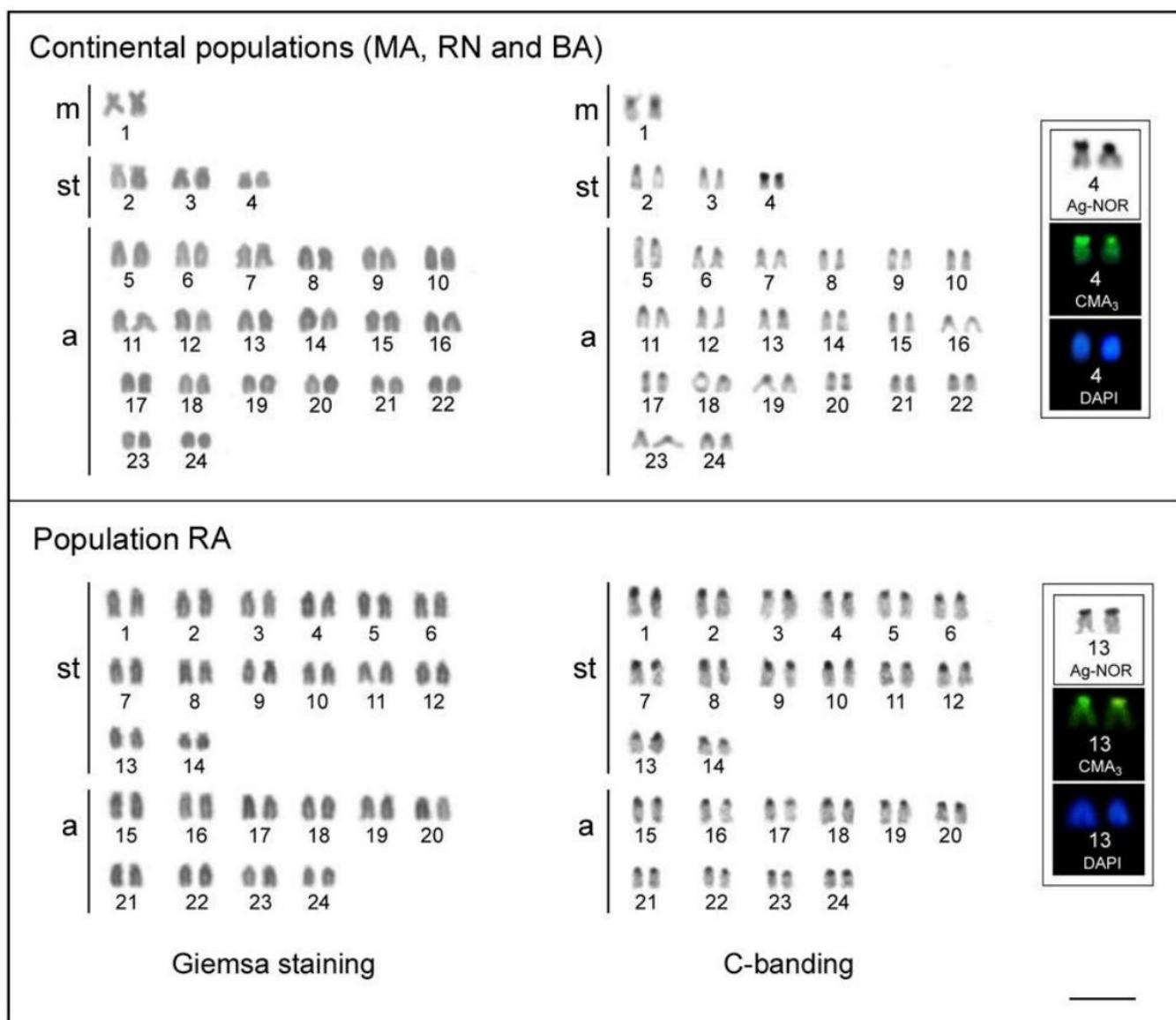


Fig. 2. Karyotypes of *Bathygobius soporator* populations MA, BA, RN and RA arranged from sequentially Giemsa-stained (left) and C-banded chromosomes (right). Chromosomes bearing Ag-NOR, CMA3⁺ and DAPI⁻ sites are boxed. Bar=5 μm.

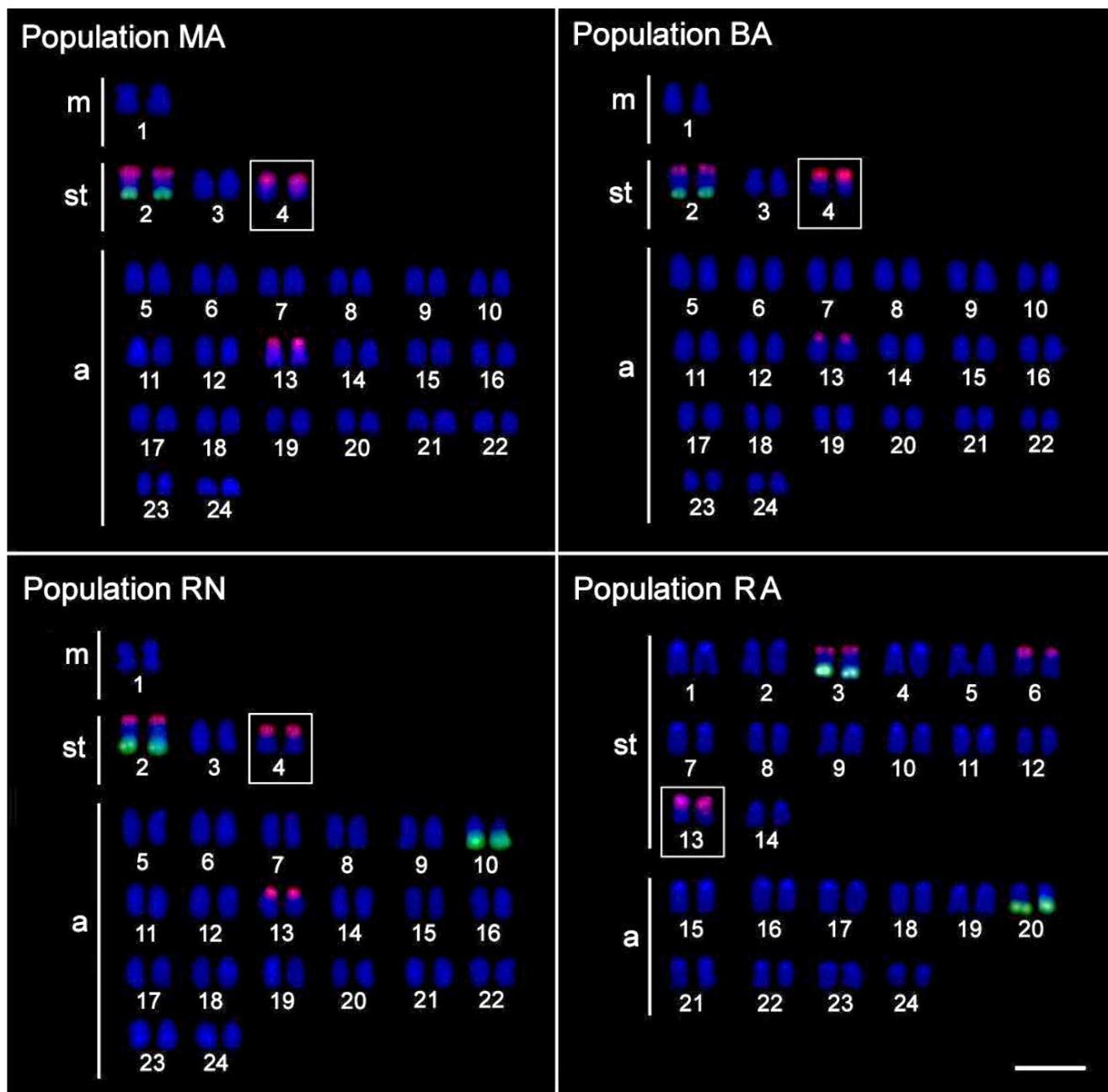


Fig. 3. Karyotypes of the *Bathygobius soporator* populations MA, BA, RN and RA arranged from chromosomes probed with 5S rDNA (green), H1 hisDNA (red) counterstained with DAPI. Chromosomes carrying 18S rDNA (red) are boxed. Bar=5 μ m.

3.3. Interpopulational morphological analysis

Continental *B. soporator* populations displayed significantly different morphological patterns, although some individuals among the groups showed intermediary morphology. In the Jackknife test group, the RA sample demonstrated complete morphological distinction in relation to the other populations. The assignment success of individuals was 76% to MA, 90% to RN and 82% to BA population.

Canonical variables 1 and 2 were the most significant, explaining 63.5% and 30.5% (MANOVA axis 1—Lambda= 0.0705, $\chi^2= 426.9265$, $p<0.0001$; Axis 2—Lambda= 426.9265, $\chi^2= 207.7570$, $p<0.0001$) (Fig. 4a), respectively, of the morphological variation observed in all the populations and 76.4% and 23.5% when analyzing only continental populations (MANOVA axis 1—Lambda= 0.2101, $\chi^2= 219.2007$, $p<0.0001$; Axis 2—Lambda= 0.6017, $\chi^2= 71.3696$, $p<0.0001$) (Fig. 4b). Discriminant function analysis found significant differences between the continental populations RN×MA ($F=15.24$; $p<0.0001$; Pillai's trace= 0.79), RN×BA ($F=15.81$; $p<0.0001$; Pillai's trace= 0.67) and MA×BA ($F=7.41$; $p<0.0001$; Pillai's trace= 0.55). The greatest morphological proximity among samples occurred between individuals from BA and MA ($D^2=2.17$), with the lowest similarity recorded between the RA and RN samples ($D^2=6.05$).

Outline drawings, created from comparative deformation grids of the first canonical variable, indicated substantially different morphotypes among RA and RN individuals with regard to positioning of the mouth, eye, body height, anterior region and set of dorsal fins (Fig. 4c). Contrasting patterns of body shape among the MA, RN and BA populations showed modifications related primarily with the position of the mouth, eye and body height (Fig. 4d, e, f).

4. Discussion

Marine teleosts generally exhibit little variability in the number of chromosomes and substantial uniformity in karyotype macrostructure (Cipriano et al., 2008). However, some groups, such as the family Gobiidae, have very diverse karyotypes (Caputo, 1998; Ene, 2003; Galvão et al., 2011) and an apparent relationship between chromosomal rearrangements and the speciation process. Some species of this family show great potential for population stratification and cytogenetic diversification (Amores et al., 1990), primarily those inhabiting large geographical areas.

However, data on populational cytogenetic analysis in Atlantic fish species are scarce (Motta-Neto et al., 2011a; 2011b). In this regard, *B. soporator* provides a particularly favorable model for analysis of chromosomal divergence in the marine environment. This is because of its biological characteristics and geographic distribution to the north and south of the Amazon/Orinoco fresh water plumes and between continental regions and oceanic islands of the Atlantic.

Genus *Bathygobius* contains 28 species (Eschmeyer, 2011), of which only three have cytogenetic descriptions: *B. soporator* from the Brazilian coast (Cipriano et al., 2008; Galvão et al., 2011), *B. fuscus* (Arai and Sawada, 1975), and *B. stellatus* (Vasil'ev, 1985). The diploid number $2n=48$ chromosomes is considered basal for Perciformes (Galetti et al., 2000). However, this value, apparently widespread in *Bathygobius*, seems to represent a synapomorphy. This indicates karyotypic derivation within the family Gobiidae, where the basal diploid number is postulated as 46 chromosomes ($FN=46$) (Vasil'ev and Grigoryan, 1993). Thus, the most common number in the genus *Bathygobius* may result from a chromosome fission event and independent pericentric inversions. In fact, the increase in number of chromosomes appears sporadic in Gobiidae, where values higher than $2n=48$ occur in *Ctenogobius criniger* ($2n=50$; Arai and Sawada, 1975), *C. smaragdus* ($2n=50$; Lima-Filho, 2011), and *Gobius niger* ($2n=52$; Vitturi and Catalano, 1989).

Cytogenetic patterns obtained for continental *B. soporator* populations (MA, RN and BA) were coincident in the number of chromosomes ($2n=48$) and the same karyotype formula ($2m+6st+40a$; $FN=56$). Although the specimens from Rocas Atoll (RA population) shared the same diploid number, they exhibited notably different karyotype structure with $28st+20a$ ($FN=76$), as well as complete morphological distinction from the other populations ($D^2>4.47$). These results, combined with previous data regarding genetic differentiation in the *Bathygobius* form present in the RA (Lima et al., 2005), clearly demonstrate the existence of suprapopulational evolutionary divergence, indicating that this population must belong to a species other than *B. soporator*.

Heterochromatic patterns in the karyotypes of continental populations, juxtaposed in the centromeric and terminal positions for some chromosomal pairs, are close to the condition most often recorded among Perciformes. On the other hand, the high number of bibrachial chromosomes found in the RA population, in addition to the

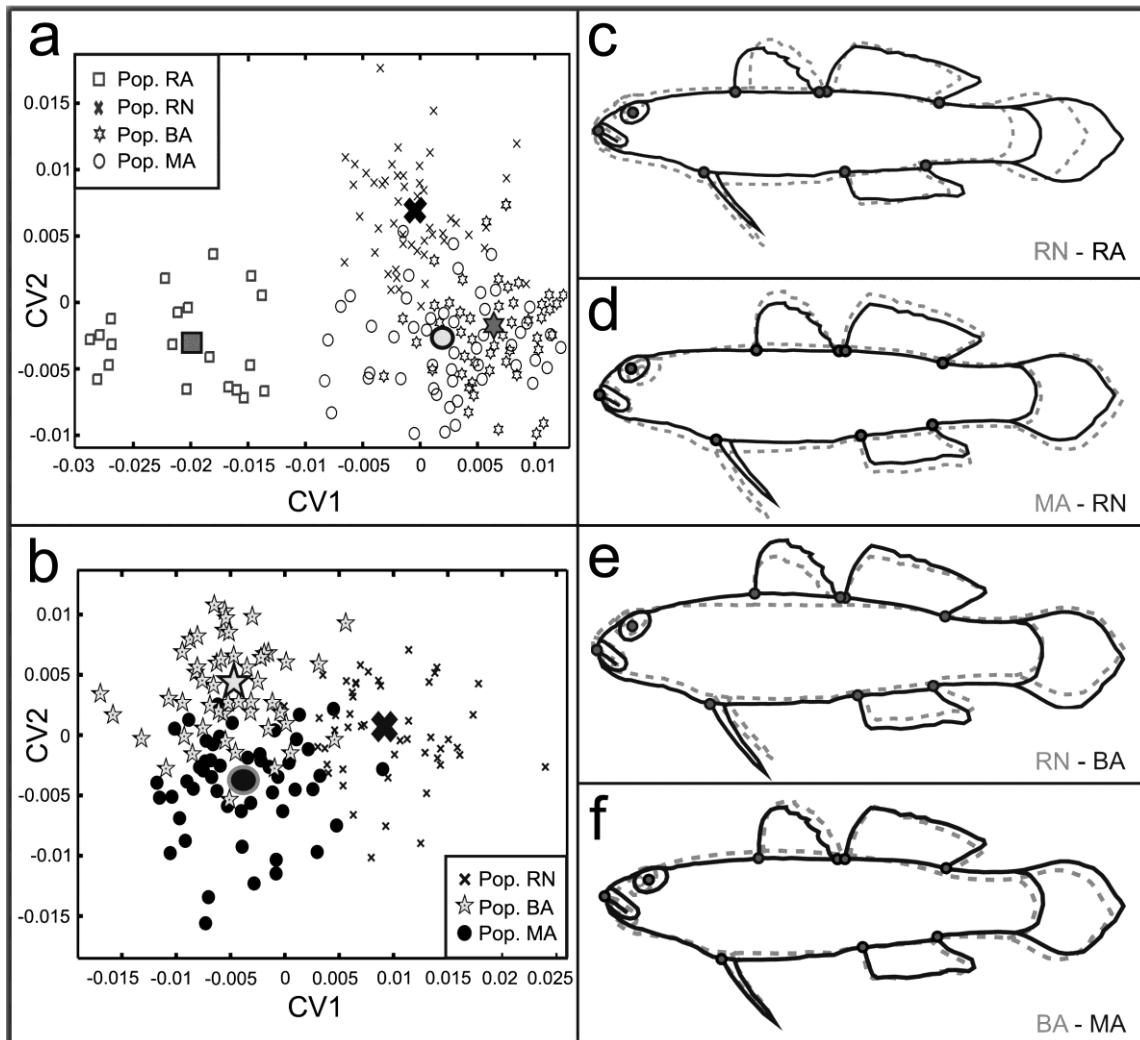


Fig. 4. Distribution of morphological data of *B. soporator* samples along the first and second canonical variables. The largest highlighted symbols indicate the morphometric mean of each population; (a) all populations including Rocas Atoll individuals ($CV_1=63.5\%$ and $CV_2=30.5\%$); (b) only continental populations ($CV_1=76.4\%$ and $CV_2=23.5\%$). Schematic drawings at c, d, e and f represent comparisons between morphotypes of the populations analyzed generated by CV_1 .

greater heterochromatic content distributed along the short arms of subtelocentric chromosomes, is also significantly different from there maining *B. soporator* populations analyzed. Substantial heterochromatic content, heterogeneous in composition, has been identified as afavorable condition to greater macro changes in chromosomes, emphasizing its role in the karyotypic diversification of many fish (Canapa et al., 2002; Molina, 2007; Molina and Galetti, 2002). Heterochromatic blocks found in the centromeric position of the metacentric chromosomes may be associated with the occurrence of Robertsonian fusions. These mechanisms are frequently observed

in the family Gobiidae and are an important source of karyotype diversity in this group (Caputo, 1998; Caputo et al., 1997; Klinkhardt, 1992).

Cytotaxonomic characteristics related to the location and frequency of ribosomal sites have proven effective in some groups of fish (Crosset al., 2006; Galetti et al., 2000). Among the continental *B. soporator* populations, Ag-NOR sites and 18S rDNA sequences are coincident and located on the short arms of pair 4. This subtelocentric chromosomal pair appears homologous with pair 13, equal in size to individuals from the RA population. A similar condition has been reported in other Gobiidae species, such as *Potamoschistus minutus*, *P. pictus* and *P. marmoratus* (Caputo, 1998; Klinkhardt, 1992). In fact, at least six different arrangement patterns for nucleolar organizer regions have been recorded among Gobiidae (Galvão et al., 2011). An association between NORs and CMA3⁺ heterochromatin, as observed in the population investigated, is often found among fish (Almeida-Toledo et al., 1996; Amemiya and Gold, 1986), which may favor rearrangements involving chromosomes carrying these sites (Vicari et al., 2003). However, this characteristic of ribosomal sites seems to vary in Gobiidae, since it is not present in nucleolar organizer regions of *Gobius niger*, which exhibit Ag-NORs⁺/45S⁺ and CMA3⁻ (Mandrioli et al., 2001).

Cytogenetic studies in fish populations have increasingly used mapping of 5S rDNA sites, both for evolutionary analyses (Martins and Galetti, 2001) and as cytopopulation markers (Aguilar and Galetti, 2008). These sites are generally present in different chromosomes from those carrying the 45S genes, a pattern commonly found in vertebrates (Lucchini et al., 1993; Suzuki et al., 1996). Indeed, 5S/45S synteny was not recorded in any of the samples investigated here. On the other hand, the 5S sites surprisingly revealed cytogenetic structuring for the RN population. Whereas in the other continental populations (MA and BA) unique 5S sequences were found in the terminal portion of the long arm on subtelocentric pair 2, in the RN population these were in multiple sites, that is, in the same position on pair 2 and in the terminal portion of the long arm on acrocentric pair 10. This cytopopulational characteristic, unique to the RN region, suggests genetic isolation of this population, which also appears to be corroborated by the diverse morphological pattern of this group in relation to the remaining continental populations. In fact, recent genetic evidence obtained from different DNA markers and mitochondrial sequences, has identified genetic isolation in fish assemblage of coastal region of RN (Benevides, 2011).

With regard to the RA population, mapping of the 5S genes showed multiple sites on the long arms of subtelocentric pair 3 and acrocentric pair 20. Considering the size, chromosome type and positioning of DNA 5S sites, these pairs are likely homologous to the two pairs found in the RN population.

Histone H1 genes have been associated with changes in the organizational structure of chromatin, need for cell cycle progression and repressing gene activity (Davie and Delcuve, 1991; Matsumoto et al., 1980). Little is known about the physical position of these genes on fish chromosomes. Mapping histone H1 genes reveals multiple conserved sites. These are present in the terminal position on the short arms of subtelocentric pair 2 and acrocentric pair 3 in all continental populations, as well as in the terminal position on the short arms of subtelocentric pairs 3 and 6 in the RN population.

Synteny of the 5S and H1 histone genes in the same chromosomal pair was also recorded among fish from the genus *Astyanax* (Hashimoto et al., 2011), in the pericentromeric position. In these species, H1 sites were also more conserved than ribosomal sites. A similar pattern was observed for all the populations analyzed, where clusters of H1 histone are present in the centromeric position and demonstrate greater conservatism than those of 5S rDNA genes. The presence of syntenic sites of 5S (long arm) and H1 (short arm) genes in pair 2 of continental populations and pair 3 of the RA population, suggests these chromosomes are homologous and share different markers.

Previous chromosomal data for *B. soporator* populations from the coast of Paraná and Rio de Janeiro in south/southeast Brazil, show karyotypes in both locations with 2m+46a ($2n=48$; FN=50) (Cipriano et al., 2008). It is possible that different chromosomal formulas for BA, RN and MA populations evaluated here are due as much to methodological difficulties as exact classification of subtelocentric chromosomes, given the higher degree of condensation or sample size.

Physical barriers between marine fish populations are not always obvious (Joyeux et al., 2001), but may play an effective role in the pelagic larval phase of many species, for which they represent the real dispersal potential (Mora and Sale, 2002; Palumbi, 1994). Gobies display characteristics apparently favorable to population subdivision (Peters, 1983). In some instances, even under the influence of transitory or weak geographical barriers, phylogeographic breaks have been identified among populations of this group of fish, with local retention of larvae around islands in the Caribbean Sea (Taylor and Hellberg, 2005; 2006).

Variations in body pattern may indicate population stratification (Molina et al., 2006). Species from the genus *Bathygobius*, found in the eastern Atlantic, are considered highly conserved in relation to their morphology. This makes it difficult to determine the number of valid species for the genus using only morphological characteristics (Tornabene et al., 2010). Indeed, traditional meristic features, used in taxonomic keys, cannot distinguish between population samples of *B. soporator* from the Brazilian coast and those from the Rocas Atoll (Lima et al., 2005), although they display conspicuous cytogenetic divergence and evidence suggesting they are different species. Nevertheless, analyses using geometric morphometrics approach show complete morphological distinction between these two forms (continental populations×Rocas Atoll). This demonstrates the effectiveness and sensitivity of the technique in recognizing cryptic fauna and solving taxonomic problems present in the genus *Bathygobius*.

The complete morphological distinction of the form found in the RA is related to its more spindle-shaped body structure, with a smaller anterior region and body height. These are associated with positioning of the mouth and eye and larger dorsal fins in relation to the RN *B. soporator* population approximately 267 km away. The combination of these modifications may be associated to greater speed of movement (Breda et al., 2005), stability when swimming (Bond, 1979) or feeding specialization (Piorski et al., 2005).

Combined genetic and morphology studies have been successfully applied to explain the evolutionary pattern in species from the genus *Bathygobius*. Analyses using both approaches, conducted with representatives of this group from the coasts of Florida to Venezuela and areas such as the Bahamas and Belize, identified two new species for the genus in the Western Atlantic, *B. geminatus* and *B. antilliensis*. The latter is suggested as a species found in the RA, based on similarities in mitochondrial sequences (Tornabene et al., 2010).

Morphologically, continental populations of *B. soporator* exhibit very different body patterns. The main morphological variation is related to body height, which rises progressively with increased latitude. Although thermal differences between populations do not seem drastic (annual mean of 26.3 °C for MA and 25.2 °C for BA) (EMBRAPA, 2011), maximum and minimum temperatures, or other ecological conditions, may be related to increased mean body height in populations distributed from North to South. This apparently clinal distribution could reflect Bergmann's rule,

associating greater latitude/reduced temperature with increased body size (Gaston et al., 2008), described for several groups of vertebrates (Lomolino et al., 2006), including fish (Macpherson and Duarte, 1994; Smith and Brown, 2002). Evidence of clinal patterns has been found in the Atlantic, in the meristic features of the Pomacentridae fish *Abudefduf saxatilis* on the Brazilian coast (Molina et al., 2006).

Interpopulational variations, such as those identified here for continental *B. soporator* populations, are becoming increasingly common in fish. Intrapopulational morphological variation is usually related to the habitat of individuals (Smith and Skúlason, 1996), where intraspecific competition acts in the correlation between morphology and habitat selection (Wilson and Turelli, 1986). In turn, interpopulational morphological differences reflect population fractionation, as well as distinct resource conditions and interaction with other species (Lavin and McPhail, 1985; Mittelbach et al., 1992).

Despite recorded variations in mouth position among MA, RN and BA populations, food assessments in other Brazilian populations from Pará (North), Bahia (Northeast) and São Paulo (Southeast), highlight the trophic characteristics of *B. soporator*, characterizing its omnivorous habit of primarily consuming crustaceans and algae (Corrêa and Uieda, 2007; Lopes and Oliveira-Silva, 1998), distinguishable from the pattern displayed by individuals from the Nigerian coast in the East Atlantic (Emmanuel and Ajibola, 2010). Local environmental and ecological characteristics, differentiated along the extensive geographic distribution of *B. soporator*, associated to reduced gene flow displayed by its populations along the Brazilian coast, suggest possible distinction of these species in eastern and western regions of the Atlantic. Genetic and morphometric research is there for recommended to help clarify this possible taxonomic inaccuracy.

The diversity found in the family Gobiidae has been explained mainly by vicariant processes, leading to allopatry (Huyse et al., 2004). Chromosomal data, combined with morphological analyses, demonstrate the biodiversity present in *B. soporator*, which appears to corroborate an evolutionary scenario of population fragmentation and adaptation to new habitats between specific populations of this species.

5. References

- Afonso, P., Porteiro, F.M., Santos, R.S., Barreiros, J.P., Worms, J., Wirtz, P., 1999. Coastal marine fishes of São Tomé Island (Gulf of Guinea). *Lif. Mar. Sci.* 17, 65-92.
- Aguilar, C.T., Galetti Jr, P.M., 2008. Chromosome mapping of 5S rRNA genes differentiates Brazilian populations of *Leporellus vittatus* (Anostomidae Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 31, 188-194.
- Almeida-Toledo, L.F., Stocker, A.J., Foresti, F., Almeida-Toledo Filho, S., 1996. Fluorescence in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces Gymnotoidei Sternopygidae). *Chromosome Res.* 4, 301-305.
- Amemiya, C.T., Gold, J.R., 1986. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1, 226-231.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G., 1990. Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces Perciformes). *Heredity* 65, 151-155.
- Arai, R., Sawada, Y., 1975. Chromosomes of Japanese gobioid fishes. *Bull. Jpn. Nat. Sci. Mus. (Tókyo)* 1, 225-232.
- Benevides, E.A., 2011. Diversidade genética conectividade populacional e a conservação do mero (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Serranidae) na costa Atlântica da América do Sul. Master thesis, Universidade Federal de Pernambuco.
- Bond, C.E., 1979. Biology of fishes. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Breda, L., Oliveira, E.F., Goulart, E., 2005. Ecomorfologia de locomoção de peixes com enfoque para espécies neotropicais. *Acta Sci. Biol. Scis.* 27, 371-381.
- Burns, M.D.M., Garcia, A.M., Vieira, J.P., 2010. Pisces Perciformes Gobiidae *Ctenogobius stigmaticus* (Poey 1860): new species record at Patos Lagoon estuary state of Rio Grande do Sul Brazil. *Check List J.* 6, 56-57.
- Canapa, A., Cerioni, P.N., Barucca, M., Olmo, E., Caputo, V., 2002. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Res.* 10, 297-304.
- Caputo, V., 1998. Nucleolar organizer (NOR) and cytotaxonomic implications in six species of gobiid fishes (Perciformes Gobiidae). *Ital. J. Zool.* 65, 93-99.
- Caputo, V., Marchegiani, F., Sorice, M., Olmo, E., 1997. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 79, 266-271.

- Carvalho, R., Soares Filho, W.S., Brasileiro-Vidal, A.C., Guerra, M., 2005. The relationships among lemons limes and citron: A chromosomal comparison Cytogenetic. Genome Res. 109, 276-282.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Centofante, L., Jacobina, U., Bertollo, L.A.C., 2009. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. Cytogenet. Genome Res. 125, 132-141.
- Cipriano, R.R., Fenocchio, A.S., Artoni, R.F., Molina, W.F., Noleto, R.B., Kantek, D.L.Z., Cestari, M.M., 2008. Chromosomal studies of five species of the marine fishes from the Paranaguá Bay and the karyotypic diversity in the marine Teleostei of the Brazilian coast Brazilian. Arch. Biol. Technol. 51, 303-314.
- Corrêa, M.O.D.A., Uieda, V.S., 2007. Diet of the ichthyofauna associated with marginal vegetation of a mangrove forest in southeastern Brazil. Iheringia Ser. Zool. 97, 486-497.
- Cross, I., Merlo, A., Machado, M., Infante, C., Canavate, J.P., Rebordinos, L., 2006. Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR (GATA)n (TTAGGG)n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. Genetica 12, 253-259.
- Davie, J.R., Delcuve, G.P., 1991. Characterization and chromatin distribution of the H1 histones and high-mobility-group non-histone chromosomal proteins of trout liver and hepatocellular carcinoma. Biochem. J. 280, 491-497.
- Dryden, I.L., Mardia, K.V., 1998. Statistical shape analysis. John Wiley & Sons, New York.
- EMBRAPA, 2011. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Banco de dados climáticos. <http://wwwbdclimacnppmembrapabr/metodophp>. Accessed 10 June 2011.
- Emmanuel, O.L., Ajibola, E.T., 2010. Food and feeding habits and reproduction in frillfin goby *Bathygobius soporator* (Cuvier and Valenciennes 1837) in the Badagry Creek Lagos Nigeria. Int. J. Biodivers. Conserv. 2, 414-421.
- Ene, A.C., 2003. Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). Mar. Biol. 142, 583-588.
- Eschmeyer, W.N., 2011. Catalog of Fishes electronic version. <http://researchcalacademyorg/ichthyology/catalog/fishcatmainasp>. Accessed 13 June 2011.
- Fanta, E., 1997. Behaviour and circadian rhythm of the fish *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. Rev. Bras. Zool. 14, 221-224.
- Galetti Jr, P.M., Aguilar, C.T., Molina, W.F., 2000. An overview on marine fish cytogenetics. Hydrobiologia 420, 55-62.

- Galvão, T.B., Bertollo, L.A.C., Molina, W.F., 2011. Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). *Comp. Cytogenet.* 5, 259-275.
- Gaston, K.J., Chown, S.L., Evans, K.L., 2008. Ecogeographical rules: elements of a synthesis. *J. Biogeogr.* 35, 483-500.
- Gibson, R.N., Yoshiyama, R.M., 1999. Intertidal fish communities, in: Horn, M.H., Martin, K.L.M., Chotkowski, M.A. (Eds.), *Intertidal fishes: life in two worlds*. San Diego Academic Press. San Diego, pp. 264-296.
- Gold, J.R., Li, C., Shipley, N.S., Powers, P.K., 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J. Fish Biol.* 37, 563-575.
- Hashimoto, D.T., Ferguson-Smith, M.A., Rens, W., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2011. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei Characiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 134, 64-71.
- Howell, W.M., Black, D.A., 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014-1015.
- Huyse, T., Houdt, J.V., Volckaert, F.A., 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae Teleostei). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 324-36.
- Imron, J.B., Hale, P., Degnan, B.M., Degnan, S.M., 2007. Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina* an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Mol. Ecol.* 16, 289-304.
- Joyeux, J.C., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L., Gasparini, J.L., 2001. Biogeography of tropical reef fish: the South Atlantic puzzle. *J. Biogeogr.* 28, 831-841.
- Klingenberg, C.P., 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 353-357.
- Klinkhardt, M.B., 1992. Chromosome structures of four Norwegian gobies (Gobiidae Teleostei) and a hypothetical model of their karyo-evolution. *Chromatin* 1, 169-183.
- Knowlton, N., 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420, 73-90.
- Lavin, P.A., McPhail, J.D., 1985. The evolution of freshwater diversity in the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): site-specific differentiation of trophic morphology. *Can. J. Zool.* 63, 2632-2638.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52, 201-220.

- Lima, D., Freitas, J.E.P., Araújo, M.E., Solé-Cava, A.M., 2005. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 320, 211-223.
- Lima-Filho, P.A., 2011. Diversificação evolutiva de gobídeos no litoral brasileiro: Padrões citogenéticos e ecomorfológicos. Master thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Lomolino, M.V., Riddle, B.R., Brown, J.H., 2006. Biogeography. Sinauer, Massachusetts.
- Lopes, P.R.D., Oliveira-Silva, J.T., 1998. Alimentação de *Bathygobius soporator* (Valenciennes 1837) (Actinopterygii: Gobiidae) na localidade de Cacha Pregos (Ilha de Itaparica) Bahia Brasil. *Biotemas* 11, 81-92.
- Lucchini, S., Nardi, I., Barsacchi, G., Batistoni, R., Andronico, F., 1993. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome* 36, 762-773.
- Luttkhuizen, P.C., 2003. Spatially structure genetic variation in a broadcast-spawning bivalve: quantitative versus molecular traits. *J. Evol. Biol.* 16, 260-272.
- Macpherson, E., Duarte, C.M., 1994. Patterns in species richness size and latitudinal range of East Atlantic fishes. *Ecography* 17, 242-248.
- Mandrioli, M., Manicardi, G.C., Machella, N., Caputo, V., 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei Gobiidae). *Genetica* 110, 73-78.
- Martins, C., Ferreira, I.A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti Jr, P.M., 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127, 133-141.
- 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.
- Matsumoto, Y., Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, T., Yamada, M., 1980. Evidence for the involvement of H1 histone phosphorylation in chromosome condensation. *Nature* 284, 181-183.
- Mittelbach, G.G., Osenberg, C.W., Wainwright, P.C., 1992. Variation in resource abundance affects diet and feeding morphology in the pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Oecologia* 90, 8-13.
- Molina, W.F., 2007. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups, in: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish cytogenetics*. Science Publishers Enfield, pp. 69-110.
- Molina, W.F., Alves, D.E.O., Araújo, W.C., Martinez, P.A., Silva, M.F.M., Costa, G.W.W.F., 2010. Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genet. Mol. Res.* 9, 1807-1814.

- Molina, W.F., Galetti Jr, P.M., 2002. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet. Mol. Biol.* 25, 373-377.
- Molina, W.F., Shibatta, O.A., Galetti Jr, P.M., 2006. Multivariate morphological analyses in continental and island populations of *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus) (Pomacentridae Perciformes) of Western Atlantic. *P. Amer. J. Aqua. Sci.* 1, 49-56.
- Mora, C., Sale, P.F., 2002. Are populations of coral reef fish open or closed. *Trends Ecol. Evol.* 17, 422-428.
- 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). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 401, 75-79.
- 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407, 97-100.
- Nelson, J.S., 2006. Fishes of the world. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Palumbi, S.R., 1994. Genetic divergence reproductive isolation and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 547-572.
- Peters, K.M., 1983. Larval and early juvenile development of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Perciformes: Gobiidae). *Northeast Gulf. Sci.* 6, 137-153.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *P. Amer. J. Aqua. Sci.* 83, 2934-2938.
- Piorski, N.M., Alves, J.R., Machado, M.R.D., Correia, M.M.V., 2005. Alimentação e ecomorfologia de duas espécies de piranhas (Characiformes: Characidae) do lago de Viana Maranhão Brasil. *Acta Amaz.* 35, 63-70.
- Robins, C.R., Ray, G.C., 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston.
- Rohlf, F.J., 2006. tpsDig version 210. Ecology and Evolution. Suny at Stony Brook. <http://lifebiosunysbedu/morph/>. Accessed 25 April 2009.
- Rohlf, F.J., Slice, D.E., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39, 40-59.
- Smith, K.F., Brown, J.H., 2002. Patterns of diversity depth range and body size among pelagic fishes along a gradient of depth. *Global Ecol. Biogeogr.* 11, 313-322.
- Smith, T.B., Skúlason, S., 1996. Evolutionary significance of resource polymorphism in fishes amphibians and birds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27, 111-133.

- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75, 304-306.
- Suzuki, H., Sakurai, S., Matsuda, Y., 1996. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell. Genet.* 72, 1-4.
- Tavolga, W.N., 1953. Spawning and embryonic development in the gobiid fish *Bathygobius soporator*. *Anat. Rec.* 117, 596-597.
- Taylor, M.S., Hellberg, M.E., 2005. Marine radiations at small geographic scales: speciation in Neotropical reef gobies (*Elacatinus*). *Evolution* 59, 374-385.
- Taylor, M.S., Hellberg, M.E., 2006. Comparative phylogeography in a genus of coral reef fishes: biogeographical and genetical concordance in the Caribbean. *Mol. Ecol.* 15, 695-707.
- Tornabene, L., Baldwin, C., Weight, L.A., Pezold, F., 2010. Exploring the diversity of western Atlantic *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae) with cytochrome c oxidase-I with descriptions of two new species. *Aqua. J. Ichthyol. Aquatic. Biol.* 16, 141-170.
- Vasil'ev, V.P., Grigoryan, K.A., 1993. Karyology of the Gobiidae. *J. Ichthyol.* 33, 1-16.
- Vasil'ev, V.P., 1985. The evolutionary karyology of fishes. Nauka Press, Moscow.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C., 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet. Genome Res.* 1001, 24-28.
- Vitturi, R., Catalano, E., 1989. Multiple chromosome polymorphism in the gobiid fish *Gobius niger jozo* L 1758 (Pisces Gobiidae). *Cytologia* 54, 231-235.
- Wilson, D.S., Turelli, M., 1986. Stable underdominance and the evolutionary invasion of empty niches. *Amer. Nat.* 127, 835-850.

Capítulo 2

Multiabordagem evolutiva em espécies Atlânticas do gênero *Bathygobius* (Gobiidae): aspectos citogenéticos, morfológicos e sequências DNA barcode

Paulo Augusto Lima-Filho^{1,4}, Ricardo de Souza Rosa², Allyson Santos de Souza¹, Gideão Wagner Werneck Félix da Costa¹, Claudio de Oliveira, Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

³ Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Macau, RN, Brasil.

Artigo submetido na revista Reviews in Fish Biology and Fisheries

Resumo

A identificação taxonômica de algumas espécies de gobídeos do gênero *Bathygobius* tem se mostrado problemática diante da ampla distribuição geográfica e tendência à estruturação populacional. Além disso, muitas espécies são críticas, o que dificulta o entendimento sobre a real diversidade neste táxon. Assim, aqui são apresentados aspectos cariotípicos e padrões morfológicos de três espécies de *Bathygobius* presentes no Atlântico Sul ocidental. Adicionalmente, foram realizadas comparações de sequências mitocondriais do gene Citocromo c Oxidase I com amostras da América Central, América do Norte e Caribe. Os resultados demonstram uma diversidade insuspeita, sugerindo a ocorrência de uma nova espécie e da necessidade de revalidação de outra para o litoral brasileiro.

Palavras-chave: Biodiversidade. Evolução cariotípica. Morfometria geométrica. COI. Nova espécie.

1. Introdução

Gobiidae, a família com maior diversidade presente no ambiente marinho, é composta por indivíduos de pequeno porte, presentes em todos os mares tropicais e subtropicais (Nelson, 2006). Nesta família, o gênero *Bathygobius* apresenta 29 espécies, das quais seis são descritas no Atlântico Ocidental, *B. antilliensis* Tornabene, Baldwin & Pezold, 2010, *B. curacao* (Metzelaar, 1919), *B. geminatus* Tornabene, Baldwin & Pezold, 2010, *B. lacertus* (Poey, 1860), *B. mystacium* Ginsburg, 1947 e *B. soporator* (Valenciennes, 1837).

As espécies de *Bathygobius* do Atlântico são consideradas altamente conservadas em relação a sua morfologia, o que torna difícil a determinação do número de espécies válidas para o gênero baseando-se apenas em características morfológicas. De fato, caracteres merísticos tradicionais têm sido apontados como ineficientes em distinguir de forma clara *B. soporator*, *B. antilliensis* e *B. lacertus* (Tornabene *et al.*, 2010), o que realça a importância do emprego de diferentes abordagens para auxiliar na elucidação taxonômica do gênero no Atlântico Ocidental.

Algumas revisões sistemáticas estão disponíveis para espécies de *Bathygobius* no Japão (Akihito, 1980), África ocidental (Miller & Smith, 1989), Pacífico oriental (Ginsburg, 1947; Miller & Stefanni, 2001). Contudo, dados sobre a filogenia das espécies do Atlântico Ocidental são ainda escassos (Ginsburg, 1947; Tornabene *et al.*, 2010; Tornabene & Pezold, 2011), sobretudo envolvendo espécies de ocorrência em ambientes insulares.

Os representantes deste gênero apresentam características comportamentais e reprodutivas, como ovos adesivos, período larval curto e deslocamento restrito (Tavolga, 1953; Gibson & Yoshiyama, 1999), que os tornam propícios à estruturação genética de suas populações. Este conjunto de fatores biológicos, associado ao elevado conservadorismo morfológico, dificulta o entendimento sobre sua real diversidade ao longo do Atlântico e torna *Bathygobius* um modelo favorável para estudos evolutivos dentro e entre regiões oceânicas no Atlântico Ocidental.

Recentes análises citogenéticas e moleculares evidenciaram, para populações insulares do Atol das Rocas de *B. soporator*, padrões distintos aos das populações continentais (Lima *et al.*, 2005; Lima-Filho *et al.*, 2012). Contrastando com outros grupos de Perciformes marinhos, que apresentam baixa variabilidade no número de cromossomos e alta uniformidade na macroestrutura cariotípica, representantes da

família Gobiidae demonstram cariotípos altamente variáveis (Galetti *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2011) e uma estreita relação entre rearranjos cromossômicos e processo de especiação, o que torna os marcadores citotaxonômicos particularmente úteis na identificação de variabilidade populacional (Lima-Filho *et al.*, 2012) e identificação de espécies crípticas (Mandrioli *et al.*, 2001; Lima-Filho *et al.*, 2014).

Aqui, são comparados os padrões cariotípicos, morfológicos e as sequências de Citocromo c Oxidase I (COI) em espécies nominais de *Bathygobius* do litoral e ilhas oceânicas brasileiras, com espécies na América Central, América do Norte e Caribe. Os dados apontam uma nova espécie para o gênero e indicam a necessidade de reavaliação taxonômica das espécies no litoral do Brasil.

2. Material e métodos

2.1. Preparações cromossômicas

Análises citogenéticas foram realizadas em *Bathygobius soporator* (n=15; 7♂/8♀), em espécimes preliminarmente identificadas como *Bathygobius* sp.1 (n=10; 5♂/5♀), até então classificada em diversos levantamentos de fauna como *B. mystacium*, provenientes do litoral do Rio Grande do Norte (RN) (5°41'57.41"S, 35°11'34.71"W), localizado na região nordeste do Brasil, e *Bathygobius* sp.2 (n=20; 7♂/13♀) do Atol das Rocas (RA) (3°51"S, 33°49"W) (Figura 1). Os exemplares foram submetidos à estimulação mitótica *in vivo overnight* através de inoculação intramuscular de complexo de抗ígenos bacterianos e fúngicos (Molina *et al.*, 2010). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensão de células do rim anterior (Gold *et al.*, 1990).

Os números diploides foram estabelecidos pela análise de cerca de trinta metáfases, coradas com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato (pH 6.8). As regiões heterocromáticas foram analisadas através de bandamento C (Sumner, 1972). Os cromossomos foram corados com os fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI (Sola *et al.*, 1992). As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram identificadas através da impregnação argêntea, de acordo com Howell e Black (1980). Dual-color FISH (*fluorescence in situ hybridization*) foi realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986). Em todas as amostras foram mapeados sítios DNA 18S e DNA 5S. A sonda de DNA 18S consistiu de uma sequência *in tandem* marcada por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (Roche), enquanto a sonda DNA 5S foi marcada com biotina-14-dATP (Invitrogen), ambas obtidas de *Lutjanus analis* (Teleostei, Perciformes). As

melhores metáfases foram fotografadas em um microscópio OlympusTM BX51, acoplado a um sistema de captura digital Olympus DP73, com o uso do software CellSens (Olympus, Japão), e utilizadas na confecção do cariótipo. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a posição do centrômero (Levan *et al.*, 1964).

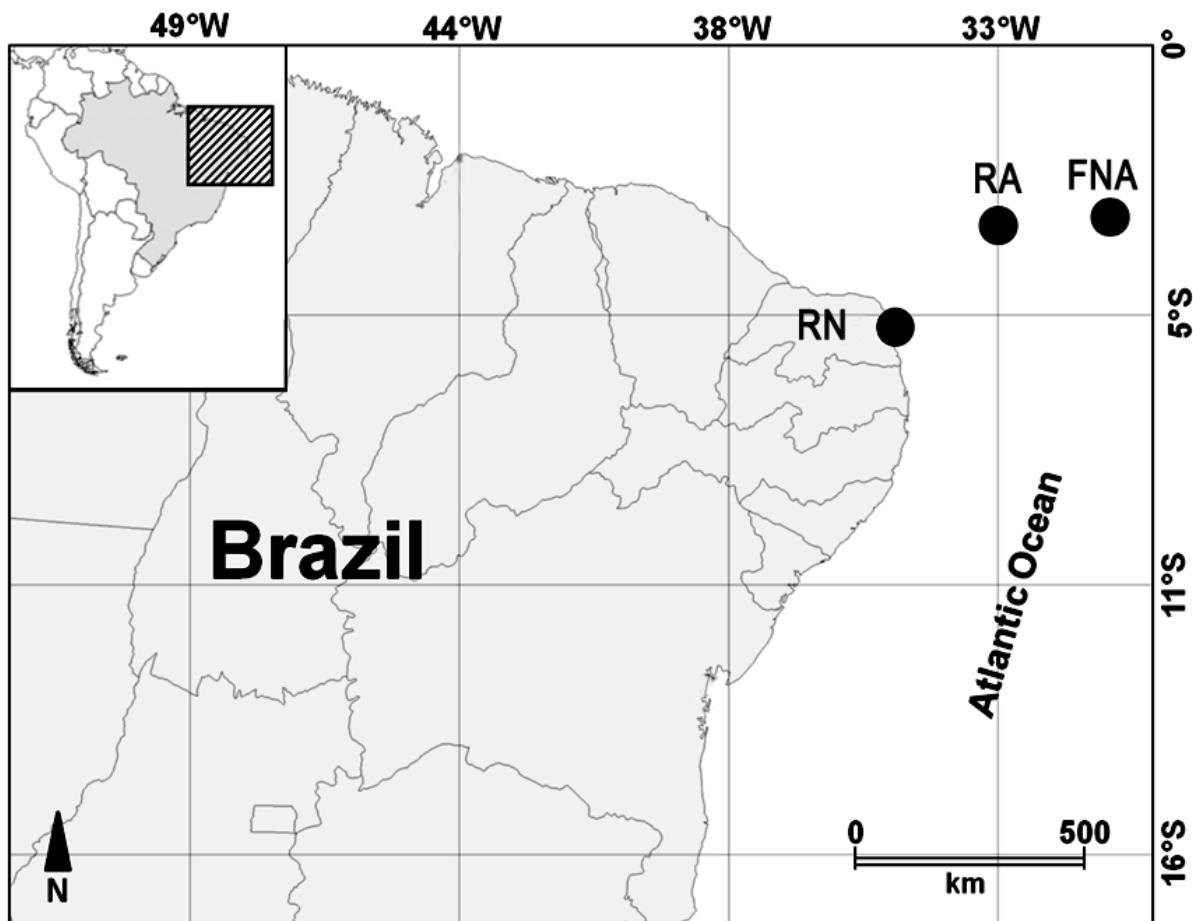


Figura 01. Pontos de coleta de *Bathygobius*, Rio Grande do Norte (RN), Atol das Rocas (RA) e Arquipélago de Fernando de Noronha (FNA).

2.2. Análise DNA mitocondrial - Citocromo Oxidase I

Fragmentos de tecido muscular e/ou hepático foram retirados de exemplares de *B. soporator* (n=5), *Bathygobius* sp.1 (n=4) e amostras de *Bathygobius* sp.2 do Atol das Rocas (RA) (n=6) e do Arquipélago de Fernando de Noronha (n=5) (FNA) (Figura 02), acondicionados em microtubos (1,5mL) contendo álcool etílico 95% e armazenados à temperatura de -20°C. O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo de Sambrook *et al.* (1989).

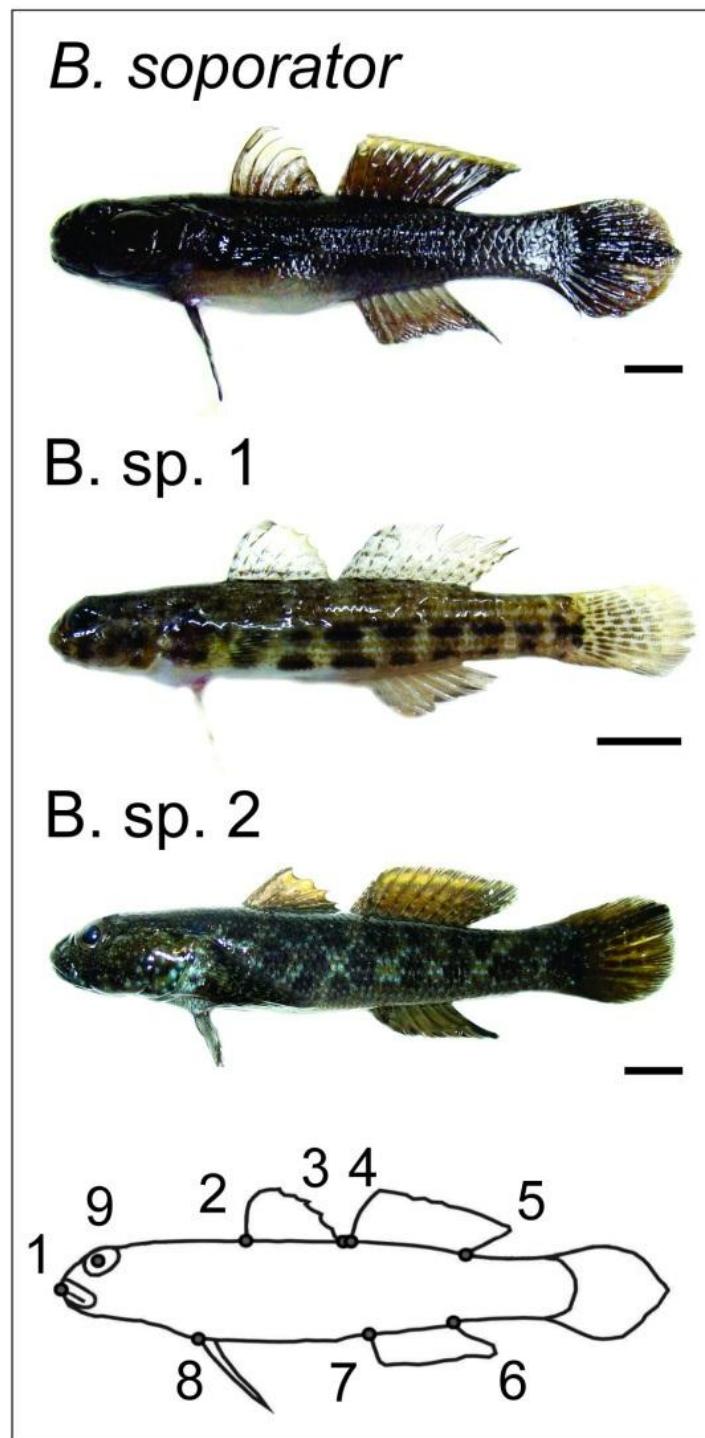


Figura 2. Espécies do gênero *Bathygobius* coletadas em áreas do litoral do Brasil e ilhas oceânicas e analisadas quanto a padrões citogenéticos, morfológicos e das sequências mitocondriais COI. 1. Extremidade distal do osso pré-maxilar; 2. Início da primeira nadadeira dorsal; 3. Fim da primeira nadadeira dorsal; 4. Início da segunda nadadeira dorsal; 5. Fim da segunda nadadeira dorsal; 6. Fim da nadadeira anal; 7. Início da nadadeira anal; 8. Início da nadadeira pélvica; 9. Posição medial do olho. Barras = 1 cm.

As reações de PCR para amplificação das sequências gene COI foram realizadas para um volume final de 25 μ l. Cada reação consistia de 1 μ l de DNA total, 0.5U Taq polimerase (Bio-Line USA, Boston, Massachusetts), 0.4 μ l de 50mM MgCl₂, 1 μ l de 10 \times buffer, 0.5 μ l 10mM dNTP, 0.3 μ l de 10 μ M dos primers FISH-BCL (5'-TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC-3') e FISH-BCH (5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Baldwin *et al.*, 2009) e água ultrapura para completar o volume final da reação. A ciclagem térmica iniciou-se com desnaturação a 95°C por 5 minutos; seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Por fim, foi realizada uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos das amplificações por PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH) seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares, utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas com o software BioEdit v.5.0.6 (Hall, 1999). Ao todo, foram obtidos 565 pares de bases (pb) do gene Citocromo c Oxidase Subunidade-I (COI), os quais foram alinhados de forma múltipla pelo software ClustalW (Thompson *et al.*, 1997). As sequências obtidas foram confrontadas com as sequências depositadas no *GenBank* destas e de outras espécies do Atlântico (Tabela 1).

As sequências foram analisadas através do programa MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2008), visando a comparações com outras espécies do gênero *Bathygobius* (Tornabene *et al.*, 2010). O modelo de substituição nucleotídica utilizado para as análises inter e intraespecíficas foi Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). A representação da distância genética entre as espécies foi estabelecida com base no método de *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987), que vem se mostrando eficiente para estudos das relações entre espécies utilizando o gene COI “*barcoding*” (e.g. Nei & Kumar, 2000; Barrett & Hebert, 2005; Rivera & Currie, 2009).

Tabela 1. Sequências do gene COI das espécies de *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1, e *Bathygobius* sp.2, e de outras espécies do Atlântico depositadas no *GenBank*.

Espécies	No. de acesso GenBank	Origem Geográfica
<i>B. soporator</i> (n=5)	KM248292-KM248296	Rio Grande do Norte (Brasil)
<i>Bathygobius</i> sp.1 (n=6)	KM248286-KM248291	Rio Grande do Norte (Brasil)
<i>Bathygobius</i> sp.2 (n=6)	KM248280-KM248285	Atol das Rocas (Brasil)
<i>Bathygobius</i> sp.2 (n=4)	KM248276-KM248279	Arquipélago de Fernando de Noronha (Brasil)
<i>B. soporator</i> (n=11)	HM748382; HM748386; HM748387; HM748388; HM748390; HM748394; HM748395; HM748405; HM748424-HM748426	USA; Venezuela; Porto Rico; Panamá
<i>B. mystacium</i> (n=10)	HM775936-HM775945	Belize
<i>B. geminatus</i> (n=10)	HM748367-HM748369; HM748373-HM748375; HM748377-HM748379; HM748389	USA; Porto Rico
<i>B. antilliensis</i> (n=10)	HM748333; HM748392; HM748393; HM748404; HM748406-HM748411	Bahamas; Porto Rico; Trinidad e Tobago
<i>B. lacertus</i> (n=1)	HM775923	Belize
<i>B. curacao</i> (n=1)	HM7759201	Belize

2.3. Análise por Morfometria Geométrica

Indivíduos adultos e sem injúrias das espécies nominalmente identificadas como *B. soporator* (n=25) e *Bathygobius* sp.1 (n=25), provenientes do Rio Grande do Norte (RN), região nordeste do Brasil, e de *Bathygobius* sp.2, provenientes do Atol das Rocas (n=25) e Arquipélago de Fernando de Noronha (n=25), foram utilizados nas análises morfométricas. Os exemplares foram fotografados em visão lateral esquerda com uma câmera digital Sony H10 de 8.1 megapixels, sob distância e posição padronizadas. Um total de 10 landmarks foi digitalizado com o uso do software TPSdig v2.16 (Rohlf, 2010a) e as imagens ordenadas em um único arquivo com o formato TPS com o uso do tpsUtil (Rohlf, 2010b). Em seguida, foi realizada a superposição Procrustes (Dryden & Mardia, 1998), análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Função Discriminante (DFA), com o uso do software MorphoJ 1.02b (Klingenberg, 2011), onde as distâncias de Mahalanobis (D^2) geradas possibilitaram a mensuração da variação da forma corporal entre as espécies de *Bathygobius*. A partir da variável canônica de maior influência na

variação morfológica, foram obtidos *warped outlines* para identificar, com maior clareza, as variações vetoriais dos *grids* de deformação entre as espécies.

3. Resultados

3.1. Estrutura cromossômica

Apesar de compartilharem um mesmo valor diploide ($2n=48$ cromossomos), as espécies *B. soporator* ($2m+6st+40a$, NF=56), *Bathygobius* sp.1 ($2m+4st+42a$, NF=54) e *Bathygobius* sp.2 ($28st+20a$, NF=76) apresentam diferenças conspícuas quanto à macroestrutura cariotípica (Figura 3), padrões de bandamentos cromossômicos e localização do DNAr 18S e DNAr 5S (Figura 4). Os blocos heterocromáticos estão distribuídos principalmente nas regiões centroméricas dos cromossomos das espécies, e se mostram mais conspícuos em *Bathygobius* sp.2 (Figura 3).

Os sítios Ag-RONs, únicas regiões CMA_3^+ , estão localizados em posição terminal nos braços curtos dos pares submetacêntricos 4 e 13 em *Bathygobius soporator* e *Bathygobius* sp.2 respectivamente, e posição intersticial em par acrocêntrico de número 5 em *Bathygobius* sp.1.

Dual-color FISH revelou que os genes DNAr 18S e 5S estavam localizados em cromossomos distintos. Os sítios DNAr 18S para todas as espécies são simples e coincidentes com as marcações Ag-RONs. Por outro lado, os sítios DNAr 5S podem ser simples ou múltiplos. Em *B. soporator* estão localizados na porção terminal dos braços longos dos pares 2 e 10, em *Bathygobius* sp.1 em posição centromérica no par 21, e em posição terminal nos pares 3 e 20, no cariotípico de *Bathygobius* sp.2 (RA).

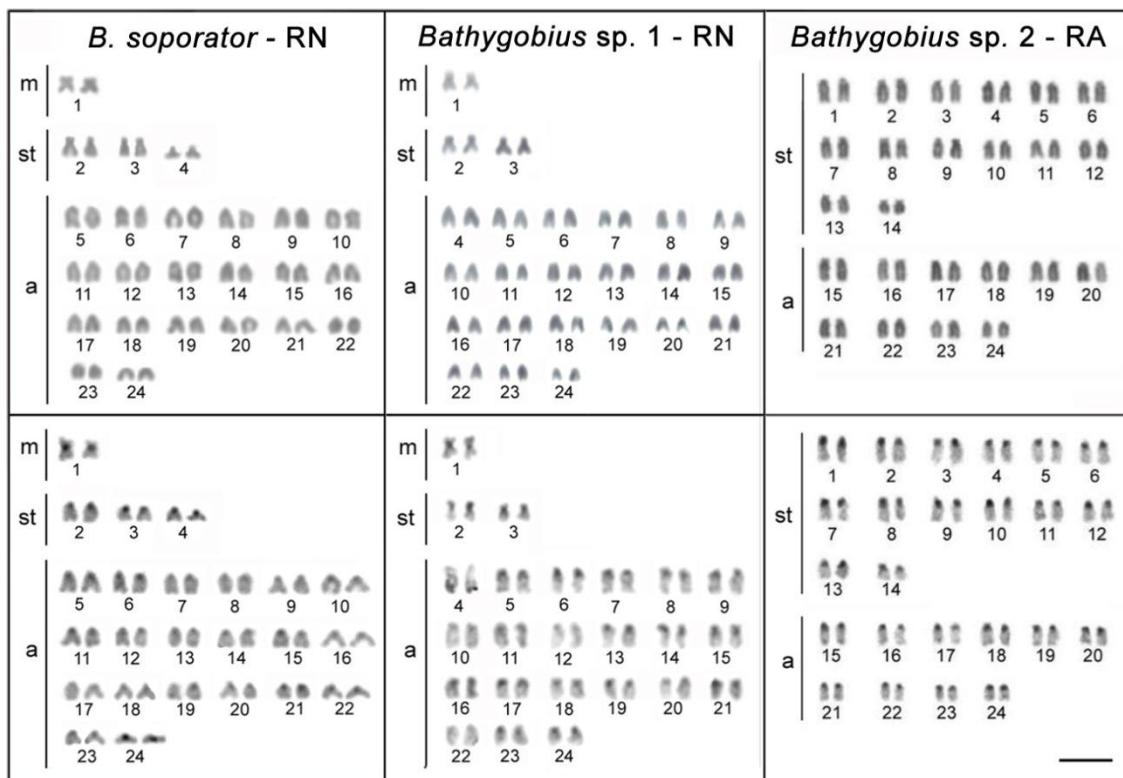


Figura 3. Cariótipos de *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1, e *Bathygobius* sp.2 (Atol das Rocas), pela coloração convencional com Giemsa (linha superior) e bandamento C (linha inferior). Barra=5μm.

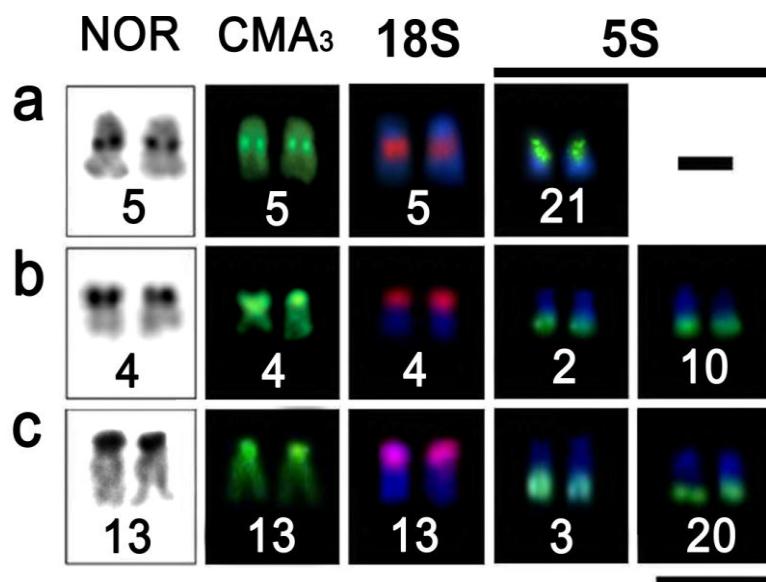


Figura 4. Pares cromossômicos portadores de sítios ribossomais em (a) *Bathygobius* sp.1 (b) *B. soporator* (c) e *Bathygobius* sp.2 (Atol das Rocas) através da técnica de Ag-NOR, coloração com CMA₃ e mapeamento de sequências DNA 18S e 5S. Barra=5μm.

3.2. DNA mitocondrial

A reconstrução filogenética a partir de sequências COI utilizando o método *neighbor-joining* permitiu a identificação de sete diferentes linhagens genéticas de *Bathygobius* no Atlântico (Figura 5). As amostras de *B. soporator* do litoral brasileiro se mostraram geneticamente similares aquelas provenientes da América do Norte, Central e Caribe ($K2P\ d=0.007\%$) (Tabela 1; Figura 5). Por outro lado, a amostra de *Bathygobius* sp.1 proveniente do litoral do Rio Grande do Norte apresenta elevada similaridade com a espécie *B. geminatus* ($K2P\ d=0.013\%$), do Caribe e América do Norte. As amostras de *Bathygobius* sp.2 do RA e FNA demonstram alta similaridade indicando ser uma mesma espécie ($K2P\ d=0.0005\%$), mas se mostram diferenciadas de *B. antilliensis* ($K2P\ d=0.054\%$), espécie com que apresenta maior relação filogenética, e de *B. soporator* ($K2P\ d=0.155\%$), espécie com a qual vinha sendo taxonomicamente nominada. A marcante diferenciação genética de *Bathygobius* sp.2 em relação às espécies do litoral do Brasil, bem como as do Caribe, sugere que esta constitui uma espécie geneticamente diferenciada de todas as demais do Atlântico.

3.3. Análises morfométricas

As variáveis canônicas 1 e 2, baseadas em dados de forma, foram as que apresentaram maior contribuição na diferenciação entre as espécies de *Bathygobius* ($CV1=70.5$; $CV2=24.5$; $p<0.001$), correspondendo juntas a 95% da variação da forma apresentada. A análise de função discriminante entre *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1, *Bathygobius* sp.2 RA e *Bathygobius* sp.2 FNA, através da quantificação da variação morfológica pela distância de *Mahalanobis*, revelou completa discriminação entre elas.

Os *warped outlines* gerados para identificar a variação da forma corporal entre as espécies de *Bathygobius*, a partir da CVI ($CV1=70.54\%$) revelaram elevada diversificação morfológica destacando variações relacionadas à posição das nadadeiras dorsal e anal, posicionamento da boca e olhos e comprimento do corpo (Figura 06).

Tabela 2. Distâncias genéticas médias entre sequências COI de *Bathygobius* do Oceano Atlântico Ocidental baseado no modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

<i>B. soporator</i>	<i>B. soporator*</i>	<i>B. sp1</i>	<i>B. mystacium*</i>	<i>B. geminatus*</i>	<i>B. sp2 RA</i>	<i>B. sp2 FNA</i>	<i>B. antilliensis*</i>	<i>B. curacao*</i>	<i>B. lacertus*</i>
<i>B. soporator</i>	0.0021	0.0184	0.0172	0.0184	0.0175	0.0175	0.0175	0.0164	0.0113
<i>B. soporator*</i>	0.0076	0.0181	0.0171	0.0181	0.0174	0.0173	0.0172	0.0164	0.0110
<i>B. sp1</i>	0.1609	0.1609	0.0185	0.0034	0.0174	0.0172	0.0161	0.0181	0.0185
<i>B. mystacium*</i>	0.1552	0.1539	0.1625	0.0183	0.0175	0.0170	0.0184	0.0186	0.0177
<i>B. geminatus*</i>	0.1646	0.1643	0.0133	0.1648	0.0178	0.0176	0.0162	0.0178	0.0182
<i>B. sp2 RA</i>	0.1559	0.1557	0.1448	0.1557	0.1547	0.0005	0.0100	0.0173	0.0176
<i>B. sp2 FNA</i>	0.1563	0.1558	0.1447	0.1525	0.1547	0.0005	0.0100	0.0172	0.0175
<i>B. antilliensis*</i>	0.1540	0.1528	0.1317	0.1619	0.1406	0.0539	0.0544	0.0169	0.0188
<i>B. curacao*</i>	0.1331	0.1348	0.1516	0.1699	0.1547	0.1390	0.1398	0.1336	0.0163
<i>B. lacertus*</i>	0.0747	0.0726	0.1671	0.1499	0.1675	0.1564	0.1568	0.1700	0.1362

Diagonal inferior = Distância genética; Diagonal superior = Erro padrão; * Sequências obtidas do GenBank. RA, Atol das Rocas; FNA, Arquipélago de Fernando de Noronha.

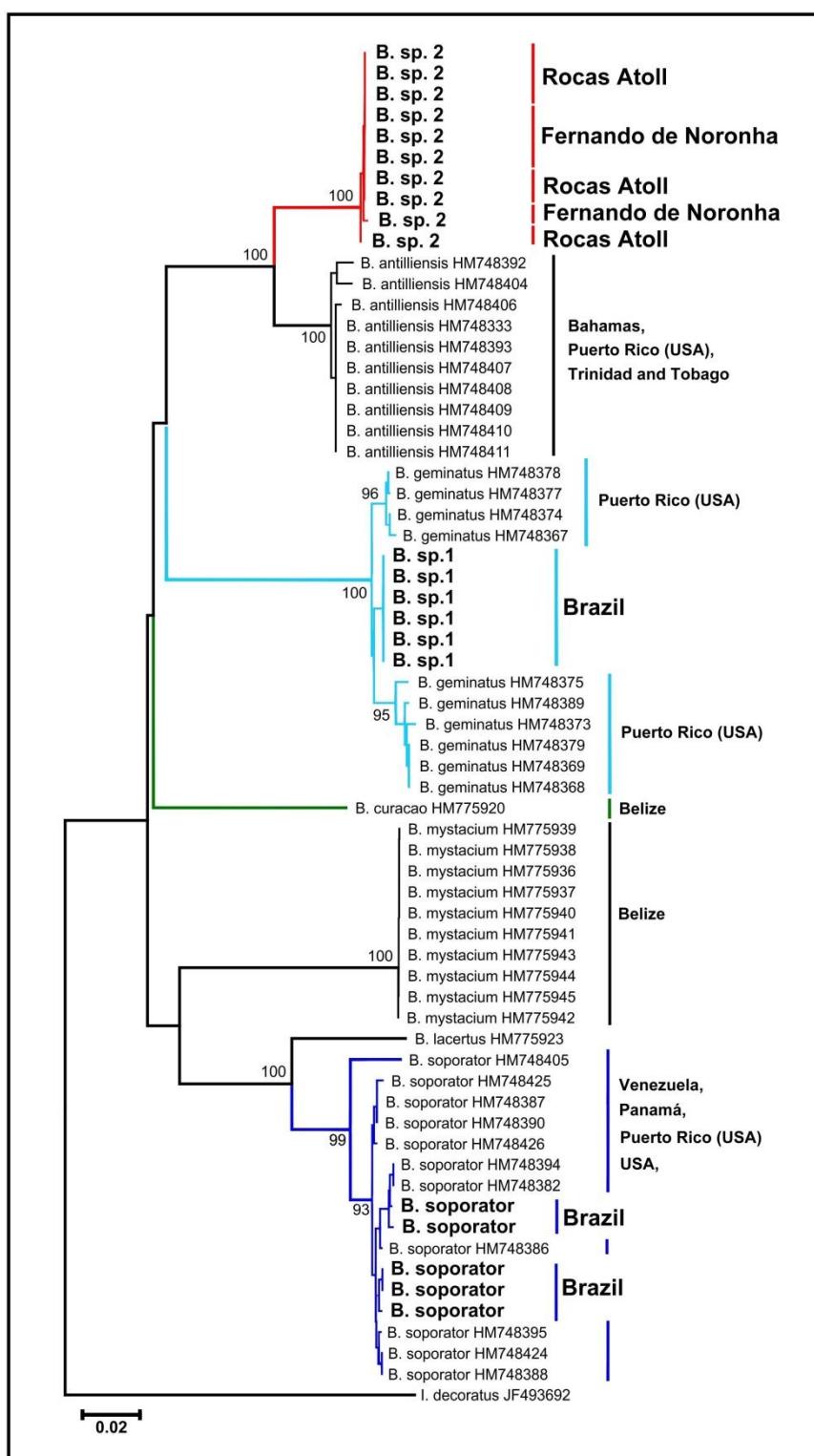


Figura 5. Árvore *neighbor-joining* derivada de sequências COI, de espécies do gênero *Bathygobius* presentes no Atlântico Ocidental. Dados em negrito correspondem às espécies do litoral nordeste do Brasil, do Atol das Rocas e Arquipélago de Fernando de Noronha. *Espécies de diferentes regiões do Atlântico Ocidental com sequências depositadas no GenBank.

Tabela 3. Distâncias de Mahalanobis (D^2) entre as espécies a partir da DFA (teste de permutação 10.000 rounds; $p > 0.001$).

	Bathygobius sp.2 RA	Bathygobius sp.1	<i>B. soporator</i>
<i>Bathygobius</i> sp.1	4.02		
<i>B. soporator</i>	5.65	5.87	
<i>Bathygobius</i> sp.2 FNA	4.57	6.08	2.60

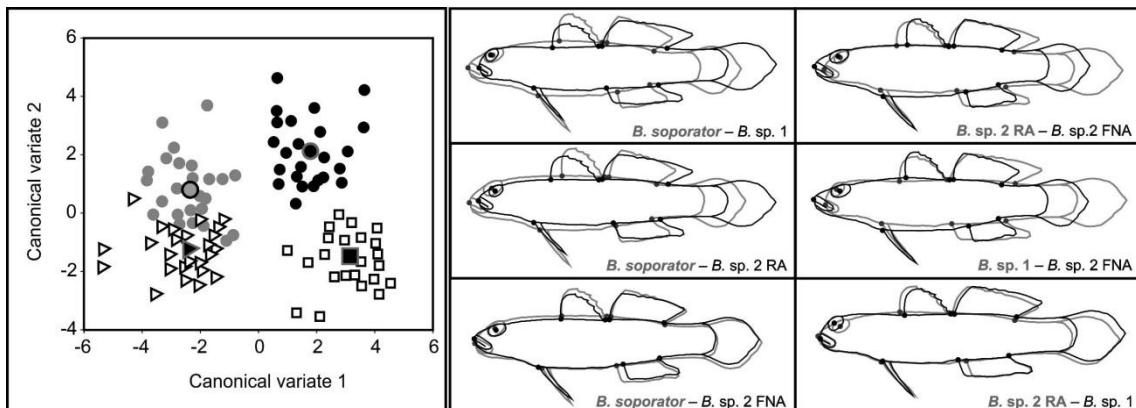


Figura 6. Análise de variáveis canônicas dos dados da forma corporal das espécies *B. soporator* (►), *Bathygobius* sp.1 (□), *Bathygobius* sp.2 RA (●) *Bathygobius* sp.2 FNA (●), entre os eixos CVI e CVII (CV1= 70.5% e CV2= 24.5%). Símbolos maiores indicam a média morfométrica apresentada por cada espécie. Nos boxes warped outlines evidenciando diferenças nas formas corporais das espécies de *Bathygobius* a partir da CV1.

4. Discussão

4.1. Diversificação cromossômica

A diversidade de espécies encontrada na família Gobiidae tem sido explicada principalmente por processos vicariantes levando à alopatria (Huyse *et al.*, 2004). Os dados cromossômicos apresentados parecem corroborar um cenário evolutivo de fragmentações populacionais seguido de diferenciação cromossômica, como eventos promotores do processo de diferenciação no gênero *Bathygobius* (Lima-Filho *et al.*, 2012).

As três espécies de *Bathygobius* analisadas apresentaram um mesmo valor diploide ($2n=48$), mas com marcante diversidade cariotípica. De fato, a presença de $2n=48$ nestas e em outras espécies de *Bathygobius* (Arai & Sawada, 1974; Lima-Filho *et al.*, 2012) sugere que seja uma condição plesiomórfica para o gênero. Por outro lado,

Bathygobius sp.1, *B. soporator* e *Bathygobius* sp.2 (RA) apresentam fórmulas cariotípicas conspicuamente diferenciadas por valores crescentes do número de braços cromossômicos (NF=54, 56 e 76 respectivamente). Tais modificações são decorrentes de processos de inversões pericêntricas, que têm sido apontados como um dos principais mecanismos de diversificação cariotípica na família Gobiidae (Vasil'ev & Grigoryan, 1993).

Aliadas à diversificação estrutural, análises de mapeamento de sequências repetitivas em algumas espécies de Gobiidae têm demonstrado marcante diferenciação quantitativa e qualitativa de DNA repetitivo em algumas espécies (Mandrioli *et al.*, 2001; Lima-Filho *et al.*, 2012; 2014). De fato, diferentemente de algumas famílias de Perciformes, em que os padrões heterocromáticos são, sobretudo, centroméricos, em Gobiidae, blocos heterocromáticos se mostram mais variáveis. Neste aspecto, o mapeamento de sítios ribossomais DNAr 18S e 5S nas três espécies se mostrou também eficaz na diferenciação citotaxonônica das espécies.

Caracteres cromossômicos vêm sendo progressivamente utilizados com sucesso na identificação de espécies crípticas de peixes (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Bertollo *et al.*, 2004). O alto nível de diversificação cariotípica observado entre as espécies analisadas no presente estudo apoia a completa distinção entre elas.

Em Gobiidae, o intenso dinamismo da macroestrutura cariotípica (Caputo *et al.*, 1997; Galvão *et al.*, 2011) e de sequências específicas nos cromossomos parece consequência do elevado nível de especiação ocorrido nesta família (Lima-Filho *et al.*, 2012). As diferenciações cariotípicas observadas não se referem a polimorfismos transitórios como identificado em diversas espécies da família (Thode *et al.*, 1988; Amores *et al.*, 1990), ao contrário revelam padrões bem estabelecidos e fixados, o que confere poucas dúvidas de que representem espécies distintas.

4.2. Diversidade no gene COI

A comparação das sequências do gene COI entre diferentes espécies do gênero *Bathygobius* permitiu, pela primeira vez, confrontar as definições taxonômicas previamente estabelecidas para espécies do gênero *Bathygobius* da Província Brasileira com suas contrapartes do Caribe.

As sequências de *B. soporator*, com distribuição no litoral brasileiro, são similares às descritas para outras áreas de ocorrência da espécie, validando sua ocorrência na Província Brasileira. Por outro lado, os exemplares de *Bathygobius* sp.1,

revelaram marcante divergência molecular com *B. mystacium*, espécie com a qual vinha sendo nominada (Carvalho-Filho, 1992; Moura *et al.*, 1999). De fato, *Bathygobius* sp.1 revela uma profunda similaridade genética com *B. geminatus* (Tornabene *et al.*, 2010) da América Central, e que até então não tinha sido descrita para a Província Brasileira. O nível de similaridade genética entre *Bathygobius* sp.1 e *B. geminatus* sugere que se trate da mesma espécie. Apesar de não se poder descartar a existência de *B. mystacium* em águas brasileiras, novos estudos visando à redefinição dos limites de distribuição geográfica de ambas as espécies se mostram necessários.

A espécie *Bathygobius* sp.2, presente no Arquipélago de Fernando de Noronha e Atol das Rocas, que até o momento vinha sendo nominada como *B. soporator* em diferentes levantamentos da ictiofauna do Atlântico, apresenta um padrão genético diferenciado de *B. soporator*. Estes dados corroboram indicações prévias de análises enzimáticas e citogenéticas (Lima *et al.*, 2005; Lima-Filho *et al.*, 2012) da marcante diferenciação genética entre estas espécies. Os dados da análise das sequências COI agruparam em um mesmo clado *Bathygobius* sp.2 e *B. antilliensis*, espécie com ocorrência no Caribe. Contudo, o nível de divergência genética entre elas sugere que se trata de uma nova espécie. Embora sejam necessários maiores estudos, é possível sugerir que, apesar da elevada capacidade de colonização de *B. soporator*, refletida na sua extensa distribuição geográfica (EUA ao Brasil), ela não habita as ilhas oceânicas brasileiras.

A maioria dos membros da família Gobiidae são habitantes bentônicos de recifes de corais, cuja alta produtividade (Fraser & Currie, 1996), elevada complexidade espacial (Lingo & Szedlmayer, 2006) e ecológica tem sido implicada nos altos níveis de diversidade (Bellwood & Wainwright, 2002). A distribuição por múltiplos habitats de áreas insulares e costeiras das províncias Biogeográfica Brasileira e Caribenha parece contribuir para a diversidade genética exibida pelas espécies de *Bathygobius*. Estes fatores promovem uma alta taxa de cladogênese, que aliada a eventos vicariantes paleogeográficos favorecem a especiação dos peixes residentes (Alfaro *et al.*, 2007).

Dados citogenéticos e morfológicos de diferentes populações de *B. soporator* do litoral do Brasil, com ampla distribuição espacial, demonstraram variações conspícuas entre algumas delas (Lima-Filho *et al.*, 2012). Tais evidências corroboram fragmentação populacional que ocasiona a diversificação genética e o desenvolvimento de padrões adaptativos locais para esta espécie.

Apesar de o Arquipélago de Fernando de Noronha e Atol das Rocas estarem localizados, respectivamente, a 340 km e 270 km da costa tropical brasileira, estes pertencem a mesma província biogeográfica (Rocha, 2003). Entretanto, o isolamento do continente e as condições ambientais locais conferem a estas ilhas um elevado grau de endemismo, onde continuamente novas espécies têm sido descritas (Sampaio *et al.*, 2004; Rangel & Mendes, 2009). A grande semelhança entre a fauna de peixes destas ilhas tem sido atribuída à presença de bancos oceânicos rasos entre estas formações que propiciam a ligação entre elas (Sampaio *et al.*, 2004).

O isolamento geográfico e papel das correntes oceânicas devem contribuir para a diversidade de espécies entre a costa brasileira e as regiões insulares. Contudo, tem sido sugerido que as populações insulares e costeiras estão submetidas a pressões de seleção divergentes, suficientes para superar o efeito de homogeneização do fluxo gênico esporádico e levar à divergência entre linhagens (Rocha, 2003). De fato, casos de especiação não-alopátrica (ecológica) foram reportados para gobídeos do gênero *Gobiodon*, onde a diversificação de espécies não era concordante com o padrão geográfico, mas há mudanças no coral anfítrio (Munday *et al.*, 2004). Em alguns casos, como em populações do gobídeo *Elacatinus evelynae*, separadas por apenas 20km, tem sido identificada uma abrupta descontinuidade genética, com diferenças nos padrões morfológicos, que teriam desempenhado um papel importante em sua diversificação (Taylor & Hellberg, 2003).

Análises utilizando sequências mitocondriais têm se mostrado úteis na determinação da variabilidade inter-específica no gênero *Bathygobius* (Tornabene *et al.*, 2010; Tornabene & Pezold, 2011). Entretanto, mesmo que caracteres moleculares permitam a identificação de novas espécies (Sperling & Hickey, 1994; Wells *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2003a, b), a delimitação de espécies idealmente requer confirmação de outras múltiplas abordagens (Funk & Omland, 2003; Dayrat, 2005; Roe & Sperling, 2007), como aqui empregado na diferenciação das espécies de *Bathygobius*.

4.3. Variação morfológica

As análises através de morfometria geométrica evidenciaram total distinção de forma entre *B. soporator*, *Bathygobius* sp.1 e *Bathygobius* sp.2 (RA). Entretanto, *Bathygobius* sp.2 (FNA) apresentou maior semelhança morfológica com *B. soporator* do que com *Bathygobius* sp.2 (RA), do qual é geneticamente mais próximo (K2P d=0.0005%) (Figura 6).

Possivelmente, as populações de *Bathygobius* sp.2 do RA e FNA compartilham com outras espécies do gênero *Bathygobius* (Tavolga, 1953; Peters, 1983) a presença de deslocamento limitado associado a características reprodutivas como ovos adesivos e curto período pelágico larval. Tais condições podem favorecer, em ambientes insulares regidos por diferentes fatores, uma seleção disruptiva de morfótipos adaptados às condições locais destes ambientes. De fato, em resposta a características ambientais, muitas espécies de peixes demonstram considerável plasticidade fenotípica que aumenta sua aptidão a um determinado ambiente (Mérona *et al.*, 2009). Quando comparado a outros ecossistemas insulares, o Atol das Rocas possui baixa diversidade de habitats (Rocha, 2003), esta condição pode ter impulsionado mudanças morfológicas na população de *Bathygobius* sp.2 devido a diferenças específicas do sistema em condições de recursos (Mittelbach *et al.*, 1992; Walker, 1997).

As variações na forma corporal entre as espécies de *Bathygobius* analisadas foram mais significativas em relação ao posicionamento das nadadeiras dorsais e anal e altura do corpo. Estas divergências ecomorfológicas sugerem adaptações relacionadas ao processo de natação, com implicações diretas sobre o uso do habitat (Wainwright *et al.*, 2007), interações bióticas (Werner, 1977) e o forrageamento (Webb, 1986). Por outro lado, as modificações morfológicas relativas ao posicionamento e tamanho da boca poderiam refletir diferentes graus de especialização alimentar, sobretudo relativos ao tipo e ao tamanho potencial da presa (Piorski *et al.*, 2005). A plasticidade fenotípica identificada entre populações de *B. soporator* (Lima-Filho *et al.*, 2012) e nas populações insulares de *B. sp.2* RA e FNA apoiam um intenso efeito ambiental sobre os padrões adaptativos locais de cada população. Esta condição confirma a dificuldade no preciso status taxonômico de algumas de suas espécies baseado apenas em caracteres morfológicos.

O uso de marcadores mitocondriais tem se mostrado adequado na identificação de formas morfológicamente crípticas dentro do gênero *Bathygobius*. Apesar de *B. soporator*, *B. antilliensis*, e *B. lacertus* se mostrarem indistinguíveis morfológicamente, a análise das sequências do gene COI indicam que não constituem um grupo monofilético (Tornabene *et al.*, 2010). A semelhança na morfologia entre as três espécies poderia ser devido à evolução convergente. De fato, a plasticidade fenotípica observada entre populações de *B. soporator* indica, provavelmente, padrões morfológicos em resposta às condições ambientais vigentes (Lima-Filho *et al.*, 2012). Contudo, a grosso modo, poderiam evidenciar um conservadorismo de um padrão

morfológico basal. A natureza homoplásica associada à diminuta dimensão morfológica no gênero *Bathygobius* torna análises filogenéticas problemáticas com base apenas na dimensão morfológica (Tornabene & Pezold, 2011). Na verdade, o uso combinado de análises genéticas e morfológicas vêm sendo crescentemente utilizado na compreensão dos processos envolvidos na diversificação filogenética tanto em Gobiidae (Taylor & Hellberg, 2003; 2005; Tornabene *et al.*, 2010; Lima-Filho *et al.*, 2012), como em diferentes grupos de organismos (Cheverud, 1988; Doebley & Stec, 1993; Larson, 1998).

Num contexto geral, a utilização em conjunto de caracteres cromossômicos, moleculares e da forma corporal se mostra muito resolutiva em estudos evolutivos do gênero *Bathygobius*. De fato, na filogenia apresentada há uma nítida diferenciação entre as posições ocupadas por *B. soporator*, *B. sp.1* (esta associada a *B. geminatus*) e *B. sp.2*. O sucesso na combinação destas técnicas consolida sua aplicação a outros representantes deste táxon, sobretudo como auxílio na obtenção de melhor conhecimento evolutivo e da composição real dos indivíduos da família.

5. Referências

- Akihito, P., Meguro, K. 1980. On the six species of the genus *Bathygobius* found in Japan. Japanese Journal of Ichthyology 27: 215–236.
- Alfaro, M. E., Santini, F., Brck, C. D. 2007. Do reefs drive diversification in marine Teleosts? Evidence from the pufferfishes and their allies (Order Tetraodontiformes). Evolution 61: 2104–2126.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G. 1990. Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces Perciformes). Heredity 65: 151-155.
- Arai, R., Sawada, Y. 1974. Chromosomes of Japanese gobioid fishes. Bulletin of the National Science Museum, Tokyo 17: 97–105.
- Baldwin C. C., Mounts, J. H., Smith. D. G., Weigt. L. A. 2009. Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. Zootaxa 2008: 1 – 22.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. Canadian Journal of Zoology 83: 481-491.
- Bellwood, D. R., Wainwright, P. C. 2002. The history and biogeography of fishes on coral reefs. pp. 5–32 in: P. F. Sale, ed. Coral reef fishes. Academic Press, San Diego, CA.

- Bertollo, L. A. C., Oliveira, C., Molina, W. F., Margarido, V. P., Fontes, M. S., Pastori, M. C., Falcão, J. N., Fenocchio, A. S. 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93: 228-233.
- Caputo, V., Marchegiani, F., Sorice M., Olmo, E. 1997. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 79: 266–271.
- Carvalho-Filho, A. 1992. Peixes: costa brasileira. São Paulo, Ed. Marca D'Água, p.304.
- Cheverud, J. M. 1989. A comparative analysis of morphological variation patterns in the papionins. *Evolution* 43: 1737–1747.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- Doebley, J., Stec, A. 1993. Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genetics* 134: 559–570.
- Dryden, I. L., Mardia, K. V. 1998. Statistical shape analysis. John Wiley & Sons, New York.
- Fraser, R. H., Currie, D. J. 1996. The species richness-energy hypothesis in a system where historical factors are thought to prevail: coral reefs. *American Natural* 148: 138–159.
- Funk, D. J., Omland, K. E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397–423.
- Galetti-Jr, P. M., Aguilar, C. T., Molina, W. F. 2000. An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420: 55-62.
- Galvão, T. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2011. Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). *Comparative Cytogenetics* 5: 259–275.
- Gibson, R. N., Yoshiyama, R. M. 1999. Intertidal fish communities, p. 264-296. In: Horn, M.H., Martin, K.L.M., Chotkowski, M.A. (Eds). *Intertidal fishes: life in two worlds*. San Diego, Academic Press, 399p.
- Ginsburg, I. 1947. American species and subspecies of *Bathygobius*, with a demonstration of a suggested modified system of nomenclature. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 37: 275–284.
- 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.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. Waard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham S., Waard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 96–99.
- Howell, W. M., Black, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Cellular and Molecular Life Sciences* 36: 1014-1015.
- Huyse, T., Houdt, J. V., Volckaert, F. A. 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetic Evolution* 32: 324-36.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klingenberg, C. P. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Larson, A. 1998. The comparison of morphological and molecular data in phylogenetic systematics. In: DeSalle, R. Schierwater, B. Molecular approaches to ecology and evolution (eds), Birkhäuser Verlag, Basel. p. 275–296.
- Levan, A., Fredga, K., Sandeberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lima, D., Freitas, J. E. P., Araújo, M. E., Solé-Cava, A. M. 2005. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320: 211-223.
- Lima-Filho, P. A., Cioffi, M. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2012. Karyoevolution and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *Journal Experimental Marine Biology Ecology* 43: 63-70.
- 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 Genome Research* 142: 197-203.
- Lingo, M. E., Szedlmayer, S. T. 2006. The influence of habitat complexity on reef fish communities in the northeastern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 76: 71–80.

- Mandrioli, M., Manicardi, G. C., Machella, N., Caputo, V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica* 110: 73–78.
- Mérona, B., Mol, J., Vigouroux, R., Chaves, P. T. 2009. Phenotypic plasticity in fish life-history traits in two neotropical reservoirs: Petit-Saut Reservoir in French Guiana and Brokopondo Reservoir in Suriname. *Neotropical Ichthyology*, 7: 683-692.
- Miller, P. J. Stefanni, S. 2001. The eastern Pacific species of *Bathygobius* (Perciformes: Gobiidae). *Revista de Biología Tropical* 1: 141–156.
- Miller, P. J., Smith, R. M. 1989. The West African species of *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae) and their affinities. *Journal of Zoology* 218: 277–318.
- Mittelbach, G. G., Osenberg, C. W., Wainwright, P. C. 1992. Variation in resource abundance affects diet and feeding morphology in the pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Oecologia* 90: 8-13.
- Molina, W. F., Alves, D. E. O., Araújo, W. C., Martinez, P. A., Silva, M. F. M., Costa, G. W. W. F. 2010. Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research* 9: 1807-1814.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética* 14: 331-357.
- Moura, R., Gasparini, J., Sazima, I. 1999. New records and range extensions of reef fishes in the western south Atlantic, with comments on reef fish distribution along the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 513-530.
- Munday, P. L., Herwerden, L. V., Dudgeon, C. L. 2004. Evidence for sympatric speciation by host shift in the sea. *Current Biology* 14: 1498–1504.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, NY. 333pp.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Peters, K. M. 1983. Larval and early juvenile development of the frillfin goby, *Bathygobius soporator* (Perciformes: Gobiidae). *Northeast Gulf Science* 6: 137-153.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 2934-2938.
- Piorski, N. M., Alves, J. R., Machado, M. R. D., Correia, M. M. V. 2005. Alimentação e ecomorfologia de duas espécies de piranhas (Characiformes: Characidae) do lago de Viana, Maranhão, Brasil. *Acta Amazônica* 35: 63-70.
- Rangel, C. A., Mendes, L. F. 2009. Review of blenniid fishes from Fernando de Noronha Archipelago, Brazil, with description of a new species of *Scartella* (Teleostei: Blenniidae). *Zootaxa* 2006: 51-61.

- Rivera, J., Currie, D. C. 2009. Identification of Nearctic Black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology* 9: 224-236.
- Rocha, L. A. 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography* 30: 1161-1171.
- Roe, A. D., Sperling, F. A. H. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetic Evolution* 44: 325-345.
- Rohlf F. J. 2010a. tpsDig, Version 2.16. Departament of Ecology and Evolution, State University of New York, New York.
- Rohlf F. J. 2010b. tpsUtil, version 1.46. Departament of Ecology and Evolution, State University of New York, New York.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Could Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampaio, C. L. S., Nunes, J. A. C. C., Mendes, L. F. 2004. *Acyrtus pauciradiatus*, a new species of clingfish (Teleostei: Gobiesocidae) from Fernando de Noronha Archipelago, Penambuco state, Notheastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 2: 205-208.
- Sola, L., Iaselli, V., Rossi, A. R., Rasch, E. M., Monaco, P. J. 1992. Cytogenetics of bisexual /unisexual species of *Poecilia*. II Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃ and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60: 229-235.
- Sperling, F. A. H., Hickey, D. A. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the Spruce budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution* 11: 656–665.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Tavolga, W. 1953. Spawning and embryonic development in the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Anatomical Record* 117: 427–460.
- Taylor, M. S., Hellberg, M. E. 2003. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299: 107– 109.
- Taylor, M. S., Hellberg, M. E. 2005. Marine radiations at small geographic scales: speciation in Neotropical reef gobies (*Elacatinus*). *Evolution* 59: 374–385.
- Thode, G., Martinez, G., Ruiz, J. L. Lopez, J. R. 1988. Complex chromosomal polymorphism in *Gobius fallax* (Gobiidae, Perciformes). *Genetica* 76: 65-71.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Tornabene, L., Baldwin, C. C., Weigt, L. A., Pezold, F. 2010. Exploring the diversity of western Atlantic *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae) with cytochrome c oxidase-I, with descriptions of two new species. *Aqua, International Journal of Ichthyology* 16: 141–170.
- Tornabene, L., Pezold, F. 2011. Phylogenetic analysis of Western Atlantic *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae). *Zootaxa* 3042: 27–36.
- Vasil'ev, V. P., Grigoryan, K. A. 1993. Karyology of the Gobiidae. *Journal of Ichthyology* 33: 1–16.
- Wainwright, P. C., Collar, D. C., Alfaro, M. E. 2007. Integrated diversification of locomotion and feeding in labrid fishes. *Biology Letters* 4: 84–86.
- Walker, J. A. 1997. Ecological morphology of lacustrine threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gasterosteidae) body shape. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 3-50.
- Webb, C. J. 1986. Karyology of the Indo-Pacific *Parioglossus raoi* (Herre) (Teleostei: Gobioidei) from Fiji. *Australian Journal Marine and Freshwater Research* 37: 347-351.
- Wells, J. D., Paper, T., Sperling, F. A. H. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Science* 46: 1098–1102.
- Werner, E. E. 1977. Species packing and niche complementarity in three sunfishes. *American Naturalist*, 111: 553–579.

Capítulo 3

Influência latitudinal no dimorfismo sexual do peixe marinho *Bathygobius soporator* (Gobiidae: Perciformes)

Paulo Augusto de Lima-Filho^{1,4}; Claudio Juan Bidau²; Carlos Eduardo Rocha Duarte Alencar³; Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Departamento de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Nacional de Río Negro, Villa Regina, Argentina.

³ Departamento de Biología, Ecología e Zoología, Universidad Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Macau, RN, Brasil.

Resumo

Gradientes ambientais no ambiente marinho podem ter significativos reflexos na variação morfológica e padrões evolutivos das populações, inclusive na variação do dimorfismo sexual dentro e entre populações de peixes. Aqui, foi analisado o dimorfismo sexual de forma, tamanho e adequação às hipótese de Rensch e Bergmann em cinco populações costeiras do gobídeo *Bathygobius soporator* ao longo de 4.000km da costa brasileira. As populações divergiram significativamente no dimorfismo da forma corporal entre os sexos, com tendência à redução do dimorfismo intrapopulacional com o aumento da latitude. A variação de tamanho corporal foi significativa entre populações e população vs. sexo e contrária a regra de Bergmann. Adicionalmente, o dimorfismo de forma entre populações de *B. soporator* não segue a regra de Rensch. Esses dados constituem um dos raros exemplos disponíveis de variação espacial, no nível de dimorfismo sexual intra e interpopulacional, associada à latitude, em peixes marinhos. Isso sugere um cenário complexo e particularizado de interações bióticas e abióticas atuando em populações locais de *B. soporator*, em largos

espaços litorâneos do Atlântico Ocidental, com profundas implicações na evolução da espécie.

Palavras-chave: Variação clinal. Regras ecogeográficas. SShD. SSD. Morfometria geométrica e tradicional.

1. Introdução

O dimorfismo sexual (SD) tem despertado o interesse de biólogos muito antes da época de Darwin, que em 1871 o considerou como decorrente do sucesso diferencial no acasalamento. A seleção sexual é dividida em dois processos complementares, a seleção intrasexual, em que indivíduos do mesmo sexo competem de diferentes formas pelo acesso a indivíduos do sexo oposto, e a seleção intersexual ou epigâmica, que envolve a escolha de membros de um sexo pelo do outro (Darwin, 1871; Ralls, 1977; Andersson, 1994; Savalli, 2001; Clutton-Brock, 2009; Fairbairn, 2013). O SD é amplamente conhecido no reino animal (Shine, 1989), cujas formas mais comuns analisadas referem-se ao dimorfismo comportamental, alimentar e morfológico, com destaque para as diferenças no tamanho, apêndices, tegumento, coloração e forma corporal (e.g. Andersson, 1994; Moller & Birkhead, 1994; Owens & Hartley, 1998; Dunn *et al.*, 2001; Stuart-Fox & Ord, 2004; Fairbairn *et al.*, 2007; Fairbairn, 2013).

As variações morfológicas existentes entre sexos podem corresponder à evolução de características que influenciam no sucesso do acasalamento, aumentando a aptidão para um ou ambos os sexos (seleção sexual). Acessoriamente, as propriedades físicas e ecológicas do meio ambiente podem guiar a evolução do dimorfismo (seleção natural). Um dado conjunto de condições ambientais durante o desenvolvimento pós-natal inicial de machos e fêmeas pode induzir respostas de aumento ou redução do dimorfismo na fase adulta (Slatkin, 1984; Badyaev, 2011). Vieses sensoriais em relação a condição de luz, aspectos alimentares e predação, podem impulsivar pressões seletivas distintas nos diferentes tipos de SD (Tsuboi *et al.*, 2012). Apesar do vasto repertório de casos de SD, seja ele morfológico, comportamental ou alimentar, pouco se sabe sobre variação sexual interpopulacional (Bidau & Martí, 2008; Lengkeek *et al.*, 2008; Kitano *et al.*, 2012).

A seleção sexual é uma força evolutiva potente, cuja ação pode rivalizar com características adaptativas importantes. Compreender como os vários mecanismos de

seleção sexual atuam dentro do contexto de ambientes variáveis é crucial para o entendimento dos processos evolutivos (Candolin & Heuschele, 2008; Walsh & Reznick, 2009; Ingleby *et al.*, 2010). Análises morfológicas em populações de diferentes grupos taxonômicos comumente demonstram variação na magnitude do dimorfismo, com base no tamanho corporal e em função de condições ambientais (e.g. Blanckenhorn, 1997; Morin *et al.*, 1999; Fischer & Fiedler, 2000; 2001; Fairbairn, 2005; Teder & Tammaru, 2005; Bonduriansky, 2007; Fernández-Montraveta & Moyalarano, 2007; Gianoli *et al.*, 2007; Mikolajewski *et al.*, 2007; Stillwell & Fox, 2007; Karl & Fischer, 2008).

A diferença no tamanho corporal entre machos e fêmeas ou Dimorfismo Sexual de Tamanho (SSD) levaram à proposição de um padrão macroecológico amplo denominado regra de Rensch (Rensch, 1950). Esta regra estabelece que, nas comparações entre as espécies, o SSD aumenta com o tamanho do corpo, quando os machos são maiores que as fêmeas, enquanto que o SSD diminui com o aumento do tamanho do corpo, quando as fêmeas são maiores. Apesar da constatação da regra de Rensch em estudos comparativos de insetos, répteis, aves e mamíferos (Fairbairn, 1997; Colwell, 2000; Kratochvil & Frynta, 2002; Sze'kely *et al.*, 2004; Johansson *et al.*, 2005; Blanckenhorn *et al.*, 2006; 2007; Raihani *et al.*, 2006), os peixes são sub-representados em estudos comparativos de SSD, regra de Rensch (Lengkeek, 2008) e Dimorfismo Sexual de Forma (SShD), mesmo com a extrema variabilidade conhecida em SSD neste grupo (Parker, 1992). Desta maneira, diante da importância evolutiva, é crescente o número de estudos em peixes envolvendo diferenças populacionais de SShD (Langerhans *et al.*, 2004; Hendry *et al.*, 2006), da relação entre SSD, SShD e variação latitudinal (Kelly *et al.*, 2013) e de testes intraespecíficos da regra de Rensch (Fairbairn & Preziosi, 1994; Fairbairn, 2005; Young, 2005; Lengkeek *et al.*, 2008; Herczeg *et al.*, 2010).

Algumas espécies de peixes marinhos são particularmente favoráveis como modelo para análise da ação de forças evolutivas. Entre estas, o gobídeo *Bathygobius soporator* que apresenta características que o associam intimamente a processos adaptativos locais. Esta espécie, considerada bentônica sedentária ou litorânea-residente (Fanta, 1997; Demartini, 1999), exibe uma larga distribuição geográfica que se estende do Sudeste dos EUA ao Sul do Brasil (Burns *et al.*, 2010; Robins & Ray, 1986) habitando poças de maré na zona intertidal (Gibson & Yoshiyama, 1999; Martins *et al.*, 2006). Análises populacionais têm demonstrado que a espécie apresenta padrões

morfológicos diferenciais ao longo de uma distribuição geográfica norte-sul no litoral brasileiro (Lima-Filho *et al.*, 2012).

As características populacionais apresentadas por *B. soporator* ao longo da costa brasileira a torna particularmente propícia para a análise da ocorrência de variação dos padrões de dimorfismo sexual, entre populações longinquaamente distribuídas, e favorável à investigação dos fatores ecológicos e evolutivos que atuam na diferenciação do SD em peixes marinhos. Assim, aqui são apresentadas análises da variação do SD intrapopulacional e interpopulacional baseado em aspectos da forma (SShD) e tamanho (SSD) corporal em cinco populações do gobídeo *B. soporator*, distribuídas ao longo do litoral brasileiro, com o uso de técnicas de morfometria geométrica e tradicional. As evidências apresentadas para as populações analisadas indicam uma relação entre a variação latitudinal e o nível do dimorfismo sexual de forma (SShD) e ausência de adequação à regra de Rensch e Bergmann.

2. Material e métodos

Um total de 321 indivíduos adultos de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837), isentos de injúrias e danos pontuais, provenientes da costa Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, foram utilizados nas análises morfométricas. No litoral nordeste os pontos de amostragem abrangeram os estados do Maranhão, MA ($2^{\circ}27'50.89"S$, $44^{\circ}12'18.58"O$; n=58; ♀ 34; ♂ 24), Rio Grande do Norte, RN ($6^{\circ}0'31.12"S$, $35^{\circ}6'17.86"O$; n=72; ♀ 39; ♂ 33), e Bahia, BA ($13^{\circ}0'37.29"S$, $38^{\circ}31'28.32"O$; n=61; ♀ 33; ♂ 28); no sudeste, os espécimes foram coletados no litoral do estado de São Paulo, SP ($23^{\circ}59'44.88"S$, $46^{\circ}15'2.89"O$; n=71; ♀ 31; ♂ 40); e litoral sul, amostras foram obtidas no estado de Santa Catarina, SC ($27^{\circ}34'21.14"S$, $48^{\circ}25'16.10"O$; n=59; ♀ 35; ♂ 24), (Figura 1a). O sexo de cada exemplar foi determinado pela observação da papila urogenital (Miller, 1961) e análise de fragmentos de gônadas examinados à fresco entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico sob aumento de 200 vezes.

2.1. Dimorfismo Sexual de forma (SShD)

Para a identificação do dimorfismo sexual de forma (SShD) foram empregadas análises de morfometria geométrica, com base na configuração de pontos anatômicos com redução dos efeitos inerentes ao tamanho (Monteiro *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2003). Sua eficácia na discriminação da forma em *B. soporator* foi previamente

demonstrada em estudos populacionais e reconhecimento de espécies crípticas neste gênero (Lima-Filho *et al.*, 2010; 2012).

Os indivíduos foram fotografados em visão lateral esquerda, ao lado de régua graduada em milímetros, com uma câmera digital Sony H10 de 8,1 megapixels, com o auxílio de um tripé fotográfico, sob distância e posição padronizadas (250 mm), sem o uso de zoom óptico ou digital. Um total de 10 *landmarks* foram definidos e digitalizados sobre as imagens com o uso do software TPSdig v2.16 (Rohlf, 2006) (Figura 1b) e as imagens ordenadas em um único arquivo com o formato TPS com o uso do software tpsUtil (Rohlf, 2013).

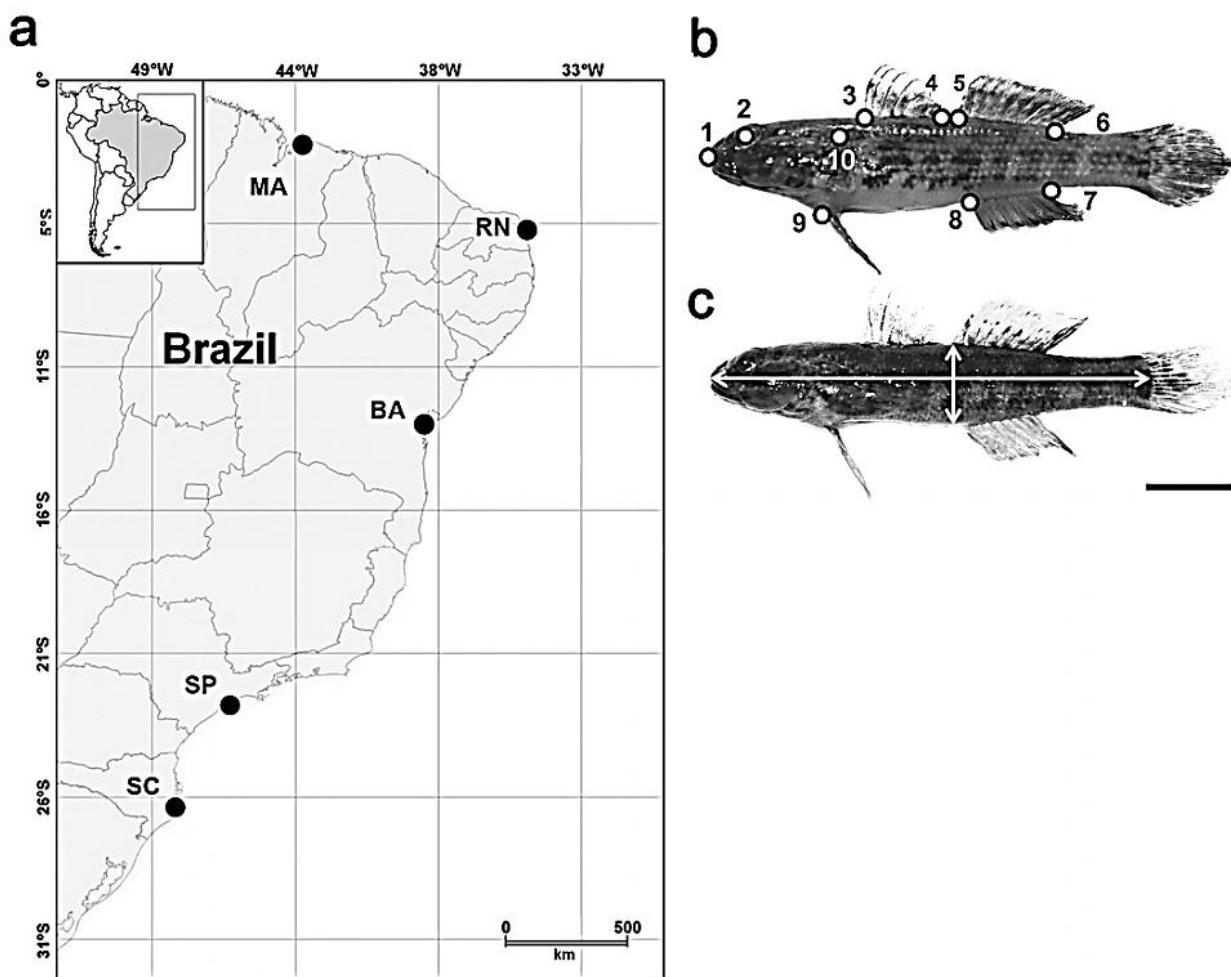


Figura 1. Mapa das áreas de coleta de *B. soporator* ao longo do litoral brasileiro. Exemplares de *B. soporator* (b) fêmea, com identificação de *landmarks* e (c) macho, com eixos das medidas de comprimento padrão e altura, utilizados nas análises morfométricas. Barra = 1cm.

As configurações dos *landmarks* foram submetidas a uma Análise Generalizada de Procrustes (GPA) (Dryden & Mardia, 1998). A análise Generalizada de Procrustes é um procedimento que retira as informações não relacionadas à variação devido à

posição, tamanho e rotação dos espécimes (Rohlf & Slice, 1990). Para comparar as variações intra e interpopulacionais de forma sem diferenças na composição de tamanho corporal dos espécimes e efeitos alométricos estáticos e ontogenéticos, foi utilizada uma correção alométrica, de acordo com os procedimentos propostos por Sidlauskas *et al.* (2011) e Alencar *et al.* (2014). Para isto, foram utilizados os resíduos de uma regressão multivariada da forma (coordenadas de Procrustes) sob o tamanho (tamanho do centroide) para as subsequentes análises estatísticas e investigação de variação da forma. A definição de alometria estática e ontogenética usados neste trabalho foi baseada em Cock (1966).

Os dados residuais numéricos gerados (sem efeito alométrico estático e ontogenético) foram analisados pela Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Função Discriminante (DFA). A CVA foi utilizada para obter uma visualização geral das variações entre Sexos *vs.* Populações. A partir da primeira variável canônica (maior variação de dados em uma ordenação), foram obtidos *warped outlines* para identificar, com clareza, os deslocamentos vetoriais dos grides de deformação entre os sexos dentro de suas respectivas populações, enquanto a DFA foi utilizada para gerar as variações de forma entre machos e fêmeas. Além disso, foram obtidos os valores de distância de Mahalanobis (D^2) nas comparações de forma corporal da DFA, entre os sexos. Variações de forma obtidas a partir da CVA e DFA foram visualizadas através de ‘outline drawing’, cuja representação alternativa da estrutura corporal facilita a interpretação das mudanças de forma a partir da forma consensual (forma média) (Alencar *et al.*, 2014).

A Análise Generalizada de Procrustes, regressão multivariada, análises multivariadas de CVA, DFA e gráficos ‘outline drawing’ foram realizados no programa MorphoJ 1.02b[®] (Klingenberg, 2011).

2.2. Dimorfismo Sexual de Tamanho (SSD) e Regra de Rensch

Inicialmente, os dados de tamanho de comprimento padrão (SL) e altura (H) foram obtidos a partir das imagens digitalizadas (Figura 1c) com o uso do software TPSdig v2.16 (Rohlf, 2006), logaritimizados (\log_{10}) e testados quanto à normalidade e homocedasticidade, respectivamente pelos testes de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) e Levene (1960). Em seguida, o SSD foi calculado como a diferença logaritimizada do tamanho médio das fêmeas e tamanho médio dos machos (Smith,

1999) para SL e H (Tabela 1). A Regra de Rensch foi testada aplicando o método de regressão ‘*Reduced Major Axis*’ (RMA) com as médias populacionais logarimitizadas do tamanho das fêmeas menos o tamanho dos machos para SL e H. A preferência por ajuste da técnica RMA (regressão do tipo II; Sokal & Rohlf, 1985) foi empregada porque a regressão linear comum (regressão do tipo I) ajusta os dados a uma linha pelo método dos mínimos quadrados dos resíduos em direção a variável independente Y, enquanto a variável dependente X é ‘condicionada’, ou seja, tem seu efeito ‘fixo’ (Kendall & Stuart, 1973, Sokal & Rohlf, 1985). De acordo com Warton *et al.* (2006), o método de regressão RMA é baseado no cálculo de um eixo principal padronizado (*major axis*, equivalente à primeira componente principal) que minimiza a soma dos quadrados das menores distâncias das amostras em relação ao eixo. Outro fator importante na escolha pelo método RMA é a potencial presença de erro em ambas as variáveis morfométricas (Warton *et al.*, 2006). Em adição, foi testada a hipótese nula do coeficiente de angulação = 1 usando intervalos de confiança de 95%. Por fim, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para as variáveis SL e H, separadamente, com teste a posteriori de Tukey-Kramer para verificar diferenças de tamanho em relação aos fatores sexo e população. As análises foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2012). O pacote “smatr” foi utilizado para as análises RMA (Warton *et al.*, 2012). Em todas as análises feitas o nível de significância adotado foi de 5% (Zar, 2010).

3. Resultados

3.1. Dimorfismo Sexual de Forma (SShD)

A análise por morfometria geométrica revelou para as variáveis canônicas 1, 2 (Figura 2), 3, 4 e 5 as maiores contribuições na diferenciação sexual intrapopulacional e interpopulacional ($CV_1=37.39$; $CV_2=20.75$; $CV_3=19.48$; $CV_4=9.56$; $CV_5=7.09$; $p<0,001$), correspondendo juntas a 94.29% da variação total da forma.

A comparação intrapopulacional e interpopulacional entre sexos, através da quantificação da variação morfológica pela distância de *Mahalanobis*, indicou uma maior distinção morfológica entre os sexos da população do MA ($D^2=3.13$), situada ao norte em latitude mais baixa, com tendência de redução progressiva do SShD em latitudes mais elevadas (BA, $D^2=2.63$; e SP, $D^2=1.75$). As populações do RN ($D^2=2.46$)

e SC ($D^2=1.95$) apresentaram valores próximos, mas levemente maiores que as amostras adjacentes (Tabela 2).

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis morfométricas de machos e fêmeas das populações de *Bathygobius soporator* e valores de SSD (*Standardized Size Dimorphism*), calculado separadamente para comprimento padrão (SL) e altura do corpo (H).

	SL	Populações				
		Machos	MA	RN	BA	SP
	Média	0.918	0.847	0.854	0.721	0.694
	S.D.	0.108	0.091	0.071	0.083	0.077
	Mínimo	0.691	0.645	0.728	0.534	0.515
	Máximo	1.064	1.046	0.957	0.867	0.814
	Fêmeas					
	Média	0.794	0.815	0.864	0.871	0.699
	D.S.	0.087	0.082	0.054	0.099	0.068
	Mínimo	0.649	0.679	0.695	0.526	0.689
	Máximo	1.030	1.003	0.908	0.938	0.976
	SSD	0.060	-0.122	-0.017	0.048	0.022
	H					
	Machos					
	Média	0.245	0.167	0.151	0.026	-0.027
	D.S.	0.112	0.096	0.061	0.082	0.100
	Mínimo	-0.004	-0.056	0.045	-0.155	-0.229
	Máximo	0.384	0.360	0.241	0.164	0.294
	Fêmeas					
	Média	0.190	0.178	0.103	-0.005	0.099
	S.D.	0.087	0.109	0.052	0.092	0.068
	Mínimo	-0.041	-0.143	0.017	-0.161	-0.022
	Máximo	0.344	0.336	0.230	0.236	0.274
	SSD	0.055	-0.126	-0.011	0.048	0.031

S.D. – Desvio Padrão; MA – Maranhão; RN – Rio Grande do Norte; BA – Bahia; SP – São Paulo; SC – Santa Catarina.

A comparação de indivíduos de mesmo sexo entre populações vizinhas evidenciou uma maior variação morfológica entre os machos, cujos valores eram progressivamente menores com o aumento da latitude (Tabela 2). Os *warped outlines* gerados a partir da CV1, indicaram elevados níveis de SShD intrapopulacional (Figura 2). Comparações entre grupos de machos de populações contíguas ao Norte do Brasil se mostraram mais distintos entre si do que aqueles das populações mais ao Sul (MA-RN,

$D^2 = 4.40$; RN-BA, $D^2 = 3.63$; BA-SP, $D^2 = 3.10$; SP-SC, $D^2 = 3.08$). Para as fêmeas a variação morfológica entre populações adjacentes foi menor que as observadas para os machos, porém também significativa (MA-RN, $D^2 = 3.47$; RN-BA, $D^2 = 2.68$; BA-SP, $D^2 = 2.86$; SP-SC, $D^2 = 2.88$).

Tabela 2. Distância de *Mahalanobis* (D^2) entre os sexos e populações pela DFA, valor de $p < 0.001$ (teste de permutação 10.000 rounds) para todos os dados. Em negrito, diferença intrapopulacional entre machos e fêmeas.

População Sexo	MA ♀	MA ♂	RN ♀	RN ♂	BA ♀	BA ♂	SP ♀	SP ♂	SC ♀
MA ♀									
MA ♂		3.13							
RN ♀	3.47	6.96							
RN ♂	4.00	4.40	2.46						
BA ♀	2.70	4.64	2.68	3.32					
BA ♂	3.08	4.25	3.59	3.62	2.63				
SP ♀	3.69	4.41	4.99	3.53	2.86	3.32			
SP ♂	4.43	3.73	6.19	4.22	3.55	3.10	1.75		
SC ♀	2.83	4.79	3.14	3.42	2.04	3.64	2.88	4.71	
SC ♂	2.59	4.01	4.67	3.93	2.67	3.06	2.21	3.08	1.95

3.2. Dimorfismo Sexual de Tamanho (SSD) e Regra de Rensch

Machos apresentaram tendência cinal de tamanho em relação a latitude. As análises de variância (ANOVA) para as medidas de SL e H se mostraram significantes para o fator População e para a interação população vs. sexo. Não foi constatada diferença entre sexos em cada ANOVA realizada. A comparação entre as populações utilizando o teste de Tukey revelou diferenças significativas entre elas, exceto entre as populações SC vs. RN para a variável H (Tabela 3). As análises de SSD interpopulacional, apresentaram um padrão igualmente divergente dos valores calculados para as variáveis de tamanho, onde os menores valores foram entre RN e BA e os maiores valores entre SP e MA.

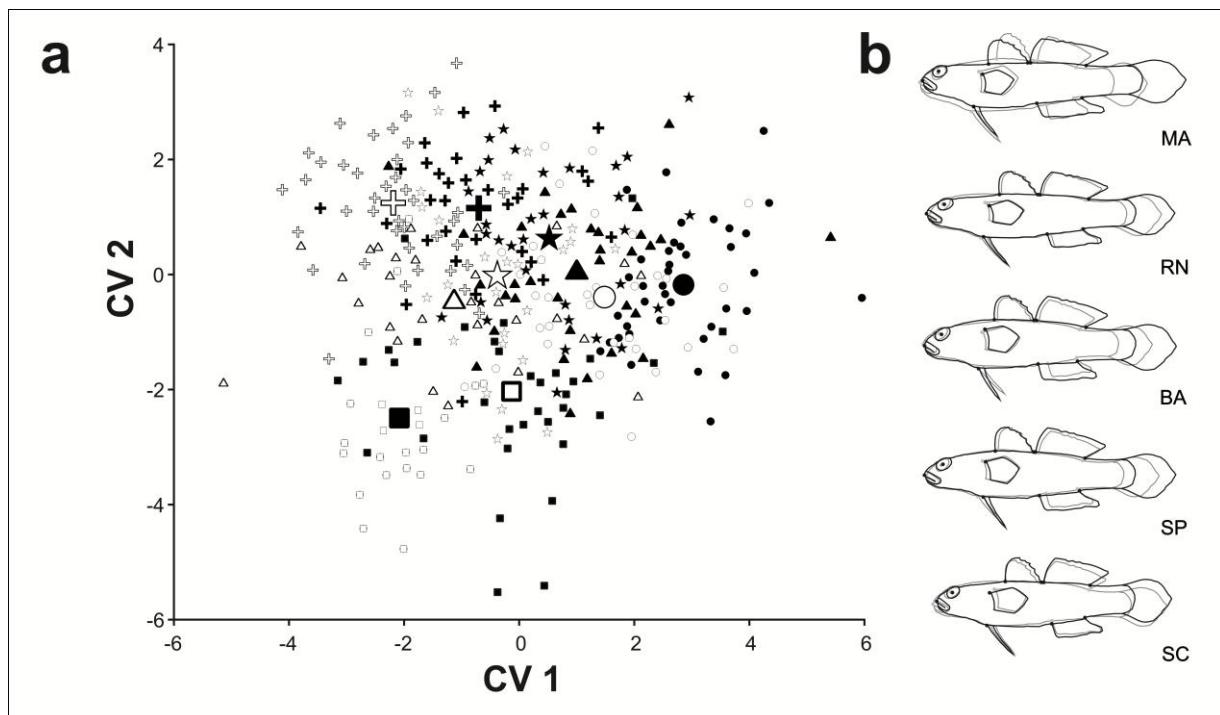


Figura 2. Distribuição dos dados morfométricos de *B. soporator* ao longo da CV1 e CV2 (a) para as populações do MA ($\square \text{♂}$; $\blacksquare \text{♀}$), RN ($\circ \text{♂}$; $\bullet \text{♀}$), BA ($\triangle \text{♂}$; $\blacktriangle \text{♀}$), SP ($+$ ♂; $+$ ♀) e SC ($\star \text{♂}$; $\star \text{♀}$). Símbolos maiores indicam a média morfométrica apresentada por machos (sem preenchimento) e fêmeas (com preenchimento). CV1= 37,39% e CV2= 20,75%, somadas correspondem a maior parte da variação da forma apresentada (58.15%). Nos boxes *warped outlines* (b) gerados a partir da CV1 entre machos (linha negra) e fêmeas (linha cinza) de cada população.

A ausência de correlação significativa das variáveis SL ($R^2=0.421$, slope=1.37, CI=0.441-4.279, H0: $p=0.235$) e H ($R^2=0.545$, slope=1.41, CI=0.050-4.010, H0: $p=0.153$), e retas isométricas (SL: $p=0.515$, H: $p=0.427$) não corroboram a ocorrência da Regra de Rensch nestas amostras (Figura 3).

4. Discussão

4.1. Variação cinal no Dimorfismo da Forma Corporal (SShD)

A família Gobiidae, com cerca de duas mil espécies, é a mais espéciosa no ambiente marinho (Nelson, 2006), está presente principalmente nos mares tropical associada a ambientes recifais (Thacker, 2009). Algumas de suas espécies podem ter extensa distribuição geográfica. Entre estas *Bathygobius soporator*, espécie bentônica, residente em regiões intertidais extremamente mutáveis e variáveis em longos transectos geográficos. Ao contrário de espécies pelágicas com capacidade de buscar condições ambientais favoráveis (Mora &

Ospína, 2001), a baixa vagilidade de adultos de *B. soporator* submete suas populações a pressões seletivas particulares aos diferentes habitats (Lima-Filho *et al.*, 2012).

Tabela 3. Análise de variância de dois fatores (Populações, Sexos) para cada variável morfométrica estudada, separadamente (SL – Comprimento padrão; H – Altura) em *Bathygobius soporator*. gl – graus de liberdade; SQ – Soma dos quadrados; MQ – Média dos quadrados; F – estatística F; p – valor de probabilidade.

SL	gl	SQ	MQ	F	p
Populações	4	1.616	0.404	57.325	<0.001
Sexo	1	0.002	0.002	0.344	0.558
Populações vs. Sexo	4	0.372	0.093	13.212	<0.001
Resíduos	318	2.241	0.007		

H	gl	SQ	MQ	F	p
Populações	4	2.249	0.562	70.128	<0.001
Sexo	1	0.001	0.001	0.159	0.691
Populações vs. Sexo	4	0.395	0.099	12.314	<0.001
Resíduos	318	2.549	0.008		

Mudanças ambientais geograficamente graduais são conhecidas como clinas. Variação clinal tem sido identificada para algumas espécies de peixes marinhos no litoral do Brasil (Molina *et al.*, 2006), que parecem refletir normas adaptativas a ambientes gradualmente variáveis. Entretanto variações clinais na forma corporal como as observadas nas populações de *B. soporator* analisadas são muito raras. Esta espécie exibe uma clara variação do dimorfismo sexual intra e interpopulacional. De fato, comparações espaciais dos valores de dimorfismo sexual entre as populações indicam um gradiente clinal que se reduz progressivamente em relação ao aumento da latitude (Norte-Sul).

Inúmeras evidências apontam a influência de fatores ambientais no incremento do dimorfismo sexual de forma. Em *zebrafish* (*Danio rerio*), dados experimentais indicam um efeito significativo da temperatura sobre a variação na forma do corpo, com consequências diferentes entre os sexos (Georga & Koumoundouros, 2010), condição também identificada para outros organismos (Fairbairn, 2005). Possivelmente, a temperatura desempenha um papel relevante também no dimorfismo sexual, pois constitui o fator ambiental adaptativo de maior importância para organismos marinhos (Mora & Ospína, 2001; Somero, 2002; Hughes *et al.*, 2003). Sua influência no ambiente pode ocasionar modificações na fisiologia das células e órgãos (Hochachka & Somero, 2002; Forster *et al.*, 2011), desta forma, atua no crescimento, taxas de reprodução e mortalidade dos indivíduos (Brey, 1995). Em vista de padrões adaptativos, seus efeitos são percebidos no tamanho e distribuição geográfica de populações

(Moore, 1975; Wilson, 1981; Grove, 1985; Arntz & Fahrbach, 1996) e, em macroescala, na estrutura de comunidades e ecossistemas (Glynn, 1988).

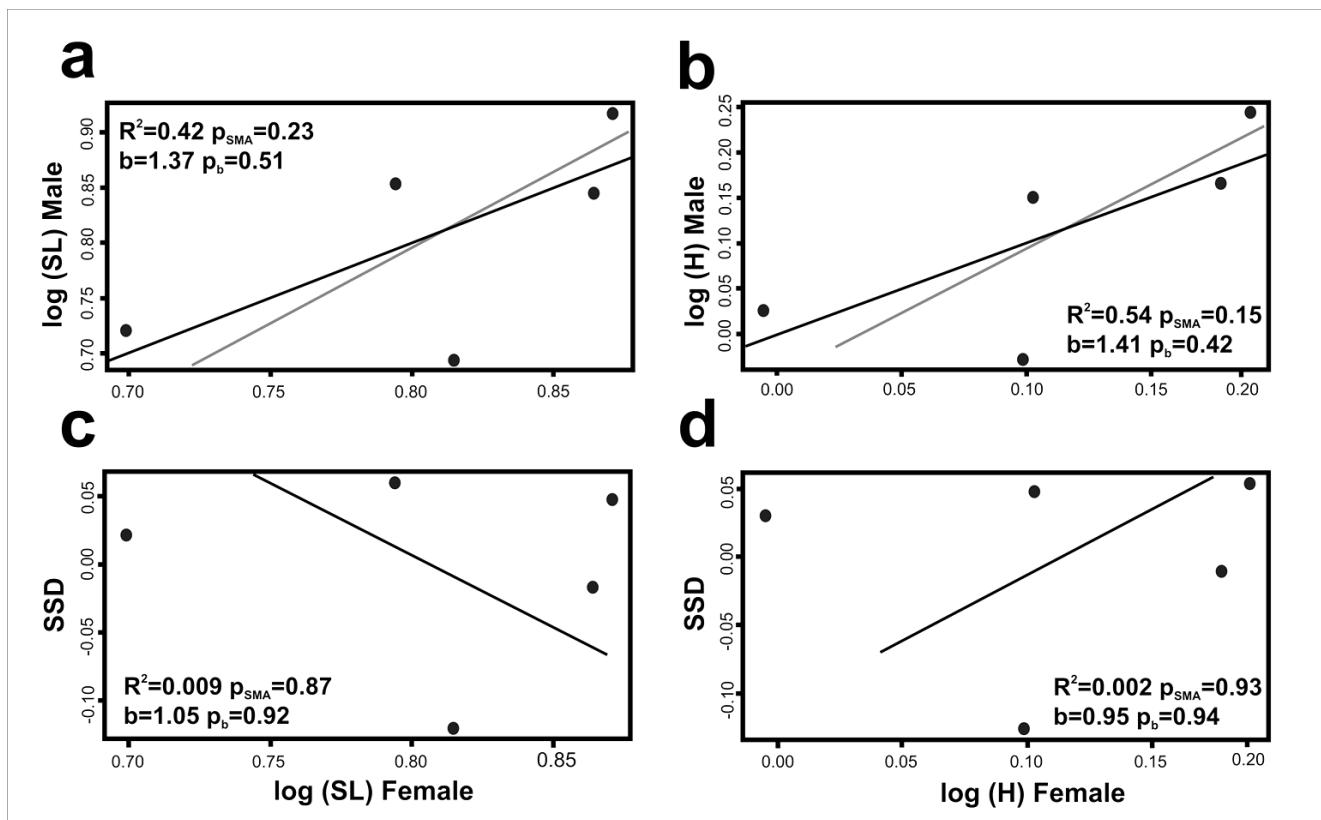


Figura 3. *Bathygobius soporator*. Regra de Rensch pela inspeção da regressão SMA com (a,b) o log da variável morfométrica de fêmeas (SL, H) pelo respectivo log da variável morfométrica dos machos (SL, H) e (c, d) pela regressão do log (SL, H) de fêmeas pelo respectivo SSD calculado. R^2 – Coeficiente de regressão RMA; pSMA – valor de probabilidade para a correlação entre as variáveis; b = coeficiente de angulação da reta estimada, pb – valor de probabilidade de isometria da reta estimada ($b=1$); linha preta – reta teórica com $b=1$; linha cinza – reta estimada pelo modelo RMA.

As populações de *B. soporator* analisadas estão distribuídas em 4.000 km de litoral em áreas que se estendem do Norte ao Sul do Brasil. Os regimes térmicos são bastante diferenciados entre os pontos mais extremos da distribuição. A população do MA, mais ao norte, com temperatura média de 28,3°C, recebe influência da Corrente das Guianas, que ruma para o norte a partir da Corrente Sul Equatorial que se bifurca em uma região *offshore* perpendicular à área ocupada pela população do RN, com temperatura média de 28,2 °C (Lumpkin & Garzoli, 2005). A corrente do Brasil, que flui paralela à costa brasileira em direção ao sul, pela costa da BA, com temperatura média de 25,5 °C, ainda no NE do Brasil, chegando a SP, com temperatura média de 23,8°C já em áreas do Sudeste. A população de

SC, a mais extrema ao Sul, com temperatura média de 16,9°C, está submetida à influência da Corrente das Malvinas (Falklands) (Stramma & England, 1999).

Os valores intrapopulacionais do SShD das duas populações mais ao norte se mostraram claramente superiores aos das duas populações mais ao sul. Algumas descontinuidades no decréscimo gradual do SShD foram identificadas em populações intermediárias das áreas amostradas podem ser reflexos de processo de fragmentação e diferenciação populacional. De fato, análises citogenéticas e morfológicas da população RN haviam identificado um padrão diferenciado das populações do MA e BA (Lima-Filho *et al.*, 2012), que corroboram estruturações populacionais de *B. soporator* ao longo da costa brasileira (Lima *et al.*, 2005). Mais ao sul, no litoral de SC, é possível que, a magnitude do dimorfismo em *B. soporator* possa refletir algum efeito ecológico da elevada produtividade do habitat, devido à riqueza em nutrientes da Corrente da Malvinas (Vooren & Brusque, 1999), que poderia influenciar variações corporais (Huston & Wolverton, 2011).

As divergências morfológicas da forma corporal de machos de populações vizinhas apontou uma nítida tendência de redução gradual em função do aumento da latitude (MA-RN, $D^2 = 4.40$; RN-BA, $D^2 = 3.63$; BA-SP, $D^2 = 3.10$; SP-SC, $D^2 = 3.08$). As divergência morfológica interpopulacionais das fêmeas foi menor que os machos, com os maiores valores encontrados para as duas populações localizadas em latitudes menores e valores aproximados para todas as outras (MA-RN, $D^2 = 3.47$; RN-BA, $D^2 = 2.68$; BA-SP; $D^2 = 2.86$; SP-SC, $D^2 = 2.88$).

A maior variação morfológica interpopulacional entre machos pode estar associada a fatores comportamentais reprodutivos e características do habitat, que promovem a seleção sexual. Em *B. soporator* os machos são escolhidos pelas fêmeas para reprodução, após preparo de abrigo que servirá para deposição de ovos e comportamento de corte exibido por vigorosas ondulações do seu corpo, e das nadadeiras peitorais e caudal, cujos movimentos na água produzem depressões rasas na areia (Tavolga, 1950).

O quanto a variação de SShD pode ser atribuída a diferenças genéticas ou plasticidade fenotípica, que em *B. soporator* é uma questão em aberto, pois, mesmo nos casos em que a seleção sexual é o principal agente propulsor do dimorfismo sexual, pressões seletivas ou restrições derivadas da predação, locomoção, nutrição e percepção sensorial podem influenciar na sua trajetória evolutiva e magnitude (Endler, 1980, 1992; Quinn *et al.*, 2001; Boughman, 2002; 2007; Reimchen & Nosil, 2004; Langerhans *et al.*, 2005; Hendry *et al.*, 2006). As interações das pressões de seleção natural e sexual se tornam mais complexas quando ambas são consideradas. A evolução de características sexualmente selecionadas pode

ser impulsionada pela concorrência dentro de um sexo (competição intrasexual), bem como pela escolha diferencial de membros do sexo oposto (seleção intersexual) (Leese *et al.*, 2009). As diferenças sexuais promovidas pela seleção sexual tornam os indivíduos do sexo conspícuo mais propensos a riscos de predação e competição, o que é compensado por um maior sucesso reprodutivo dos reprodutores (Samia *et al.*, 2015).

O dimorfismo sexual é variável e pode diferir entre populações em relação em intensidade da seleção sexual (Delph & Bell, 2008). Contudo, pode ser difícil mensurar separadamente estes mecanismos, pois os mesmos caracteres que são importantes para a competição entre machos podem desempenhar um papel na escolha do companheiro do sexo oposto (Berglund *et al.*, 1996; Qvarnström & Forsgren, 1998; Wong & Candolin, 2005; Hunt *et al.*, 2009).

Análises entre populações de espécies de peixes da família Goodeidae indicaram maiores diferenças genéticas, em populações mais dimórficas o que implica em menor fluxo gênico e diferenciação acelerada (Ritchie *et al.*, 2007). Tem sido proposto que as espécies susceptíveis à forte seleção sexual evoluem mais rapidamente seu isolamento sexual (Darwin, 1871; Lande, 1982; Gavrilets, 2000). Da mesma forma, é provável que o marcante dimorfismo sexual observado em *B. soporator* contribua para a estruturação genética populacional observada nesta espécie (Lima *et al.*, 2005) no litoral brasileiro.

4.2. Regras ecogeográficas e SSD

O dimorfismo sexual de tamanho (SSD) como identificado em *B. soporator* pode ter importantes reflexos na ecologia, comportamento e dinâmica populacional. A latitude pode afetar diferentemente os dois性os em função de história de vida e esforço reprodutivo diferencial mediado por mudanças climáticas. De fato, muitas interações interespécificas, tais como predação, mostram clinas latitudinais (Díaz *et al.*, 2013). Risco de predação constitui um dos fatores capazes de selecionar diferenças no tamanho do corpo entre os sexos (Hernandez-Jimenez & Rios-Cardenas, 2012). O SSD pode ainda ser influenciado pela latitude em razão da maior disponibilidade de recursos o que pode afetar o potencial para a poliginia (Isaac, 2005).

Algumas regras, como a regra de Rensch e de Bergmann que procuram descrever padrões em macroescala da variação corporal podem interferir na expressão do dimorfismo sexual. A regra de Bergmann que descreve que organismos tendem a ser maiores em climas mais frios demonstrou uma tendência inversa nas populações de machos de *B. soporator*.

Embora descrita inicialmente para organismos endotérmicos, não se mostra universal (Ashton *et al.*, 2000; Ashton & Feldman, 2003). Como *B. soporator*, alguns ectotérmicos apresentam clinas inversas à regra de Bergmann nas quais o tamanho do corpo tende a diminuir em climas mais frios (Mousseau 1997; Ashton & Feldman, 2003). O período das estações além da temperatura reduz a disponibilidade de crescimento em latitudes maiores devido a restrições ao forrageamento, crescimento e desenvolvimento a que o tamanho corporal está associado (Blanckenhorn *et al.*, 2006). Algumas destas condições poderiam, associadas ou independentemente, contribuir para tamanhos corporais progressivamente menores de *B. soporator* nas regiões mais frias de sua distribuição.

A regra de Rensch foi originalmente formulada para explicar a variação interespecífica no dimorfismo sexual, entretanto, ela também pode explicar a variação do dimorfismo entre populações (Lengkeek *et al.*, 2008; Herczeg *et al.*, 2010). Testes referentes ao padrão de dimorfismo intrapopulacional, apesar de raros, são fundamentais para confirmação do surgimento de modelos macroevolutivos a partir de processos microevolutivos (Blanckenhorn *et al.*, 2006). Apesar de contrastar com algumas outras espécies de peixes, que exibem para suas populações uma versão latitudinal para regra de Rensch (Lengkeek *et al.*, 2008; Herczeg *et al.*, 2010), análises mais amplas têm indicado que em um grande número dos táxons, a variação intraespecífica de SSD não está em conformidade com a regra de Rensch (Blanckenhorn *et al.*, 2006).

Padrões intra-específicos de SSD que corroboram a regra de Rensch podem ser explicados pela adaptação genética local à intensidade da seleção sexual de machos (Fairbairn & Preziosi, 1994), ou como produto de machos com plasticidade fenotípica de tamanho, superior a fêmeas. Lengkeek *et al.* (2008) sugerem que a plasticidade fenotípica pode estar subjacente à variação interpopulacional em peixes blenídeos do Mediterrâneo. As causas deste padrão ainda não são claras e provavelmente decorrem de múltiplos fatores através da distribuição de um táxon (Fairbairn 1997; 2005). Assim, as indicações de grande plasticidade fenotípica interpopulacional na espécie *B. soporator* (Lima-Filho *et al.*, 2012), de fato sugere que fatores complexos possam estar atuando sobre suas populações.

A análise comparativa do dimorfismo sexual presente em diferentes populações de *B. soporator* evidencia uma variação do SShD latitudinal, que se minimiza nas populações mais ao Sul da costa brasileira. Esta condição, associada ao estabelecimento de caracteres sexuais favoráveis, pode vir a desempenhar um papel importante na redução do fluxo gênico entre

suas populações e consequentemente em processos iniciais de diversificação dentro da espécie e acrescenta novas perspectivas à busca da melhor compreensão dos fatores ecológicos e evolutivos que atuam nos processos vicariantes, que permitiram tamanha diversidade à família Gobiidae e demais grupos de peixes marinhos.

5. Referências

- Alencar, C. E. R. D., Lima-Filho P. A., Molina, W. F. F. Freire, A. M. 2014. Sexual shape dimorphism of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda, Ucididae) accessed through geometric morphometric. The Scientific World Journal, Doi: 10.1155/2014/206168, 8p.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Arntz, W., Fahrbach, E. 1996. El Niño, experiment climático de la naturaliza. Fondo de la Cultura Económica, Mexico.
- Ashton, K. G., Feldman, C. R. 2003. Bergmann's rule in non- avian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. Evolution 57:1151–1163.
- Ashton, K. G., Tracy, M. C., Queiroz, A. 2000. Is Bergmann's rule valid for mammals? Am. Nat. 156:390–415.
- Badyaev, A. V. 2011. Origin of the fittest: Link between emergent variation and evolutionary change as a critical question in evolutionary biology. Proceedings of Royal Society, Biological Sciences 278: 1921-1929.
- Bellwood, D. R., Wainwright, P. C. 2002. The history and biogeography of fishes on coral reefs. Pp. 5-32 in: P. F. Sale, ed. Coral reef fishes. Academic Press, San Diego, CA.
- Berglund, A., Bisazza, A., Pilastro, A. 1996. Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. Biological Journal of the Linnean Society 58: 385-399.
- Bidau, C. J., Martí, D. A. 2008. Geographic and climatic factors related to a body-size cline in *Dichroplus pratensis* Bruner, 1900 (Acrididae, Melanoplinae). Journal of Orthoptera Research 17: 149-156.
- Blanckenhorn, W. U. 1997. Altitudinal life history variation in the dung flies *Scathophaga stercoraria* and *Sepsis cynipsea*. Oecologia 109: 342-352.
- Blanckenhorn, W. U., Stillwell, R. C., Young, K. A., Fox, C. W., Ashton, K. G. 2006. When Rensch meets Bergmann, does sexual size dimorphism change with latitude? Evolution 60: 2004-2011.
- Bonduriansky, R. 2007. The evolution of condition dependent sexual dimorphism. American Naturalist 169: 9-19.

- Boughman, J. W. 2002. How sensory drive can promote speciation. Trends in Ecology and Evolution 17: 571-577.
- Brey, T. 1995. Temperature and reproductive metabolism in macrobenthic populations. Marine Ecology Progress Series 30: 159-166.
- Burns, M. D. M., Garcia, A. M., Vieira, J. P., 2010. Pisces Perciformes Gobiidae *Ctenogobius stigmaticus* (Poey 1860): new species record at Patos Lagoon estuary state of Rio Grande do Sul Brazil. Check List Journal 6: 56-57.
- Candolin, U., Heuschele, J. 2008. Is sexual selection beneficial during adaptation to environmental change? Trends in Ecology & Evolution 8: 446-452.
- Clutton-Brock, T. H. 2009. Sexual selection in females. Animal Behaviour 77: 3-11.
- Cock, A. G. 1966. Genetical aspects of metrical growth and form in animals. Quarterly Review of Biology 41: 131-190.
- Colwell, R. K. 2000. Rensch's Rule crosses the line: Convergent allometry of sexual size dimorphism in hummingbirds and flower mites. American Naturalist 156: 495-510.
- Darwin, C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. J. Murray, London.
- Delph, L. F., Bell, D. 2008. A test of the differential-plasticity hypothesis for variation in the degree of sexual dimorphism in *Silene latifolia*. Evolutionary Ecology Research 10: 61-75.
- Demartini, E. E. 1999. Intertidal spawning, p. 143-164 In: Horn, M.H., Martin, K.L.M., & Chotkowski, M.A. (Eds). Intertidal Fishes: life in two worlds. San Diego, Academic Press. 399p.
- Díaz M, Møller AP, Flensted-Jensen E, Grim T, Ibáñez-Álamo JD, Jokimäki J, Markó G, Tryjanowski P. 2013 The geography of fear: a latitudinal gradient in anti-predator escape distances of birds across Europe. PLoS ONE 8, e64634.
- Dryden, I. L., Mardia, K. V. 1998. Statistical shape analysis. John Wiley & Sons, New York.
- Dunn, P. O., Whittingham, L. A., Pitcher, T. E. 2001. Mating system, sperm competition, and the evolution of sexual dimorphism in birds. Evolution 55: 161-175.
- Endler, J. A. 1980. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. Evolution 34: 76-91.
- Fairbairn, D. J. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 28: 659-687.
- Fairbairn, D. J. 2005. Allometry for sexual size dimorphism: testing two hypotheses for Rensch's rule in the water strider *Aquarius remigis*. The American Naturalist 116: 69-84.

- Fairbairn, D. J. 2013. Extraordinary Differences between the Sexes in the Animal Kingdom. 328 pp. Princeton University Press. ISBN: 9781400847600
- Fairbairn, D. J., Blanckenhorn, W. U., Székely, T. 2007. Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism. Oxford University Press, New York.
- Fairbairn, D. J., Preziosi, R. F. 1994. Sexual selection and the evolution of allometry for sexual size dimorphism in the waterstrider, *Aquarius remigis*. *The American Naturalist* 144: 101-118.
- Fanta, E. 1997. Behaviour and circadian rhythm of the fish *Bathygobius soporator* (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. *Revista Brasileira de Zoologia* 14: 221-224.
- Fernandez-Montraveta, C., Moya-Larano, J. 2007. Sex-specific plasticity of growth and maturation size in a spider: implications for sexual size dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1689-1699.
- Fischer, K., Fiedler, K. 2000. Sex-related differences in reaction norms in the butterfly *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Oikos* 90: 372-380.
- Fischer, K., Fiedler, K. 2001. Dimorphic growth patterns and sex-specific reaction norms in the butterfly *Lycaena hippothoe sumadiensis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 210-218.
- Forster, J., Hirst, A. G., Woodward, G. 2011. Growth and development rates have different thermal responses. *The American Naturalist* 178: 668-678.
- Garcia, A. M., Vieira, J. P., Winemiller, K. O., Raseira, M. B. 2004. Reproductive cycle and spatiotemporal variation in abundance of the one-sided live bearer *Jenynsia multidentata*, in Patos Lagoon, Brazil. *Hydrobiologia* 515: 39-48
- Gavrilets, S. 2000. Rapid evolution of reproductive barriers driven by sexual selection. *Nature* 403: 886-889.
- Georga, I., Koumoundouros, G. 2010. Thermally induced plasticity of body shape in adult zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Morphology* 271: 1319-1327.
- Gianoli, E., Suárez, L. H., González, W. L., González-Teuber, M., Acună, R. I. S. 2007. Host-associated variation in sexual size dimorphism and fitness effects of adult feeding in a bruchid beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 233-237.
- Gibson, R. N., Yoshiyama, R. M. 1999. Intertidal fish communities, p. 264-296. In: Horn, M. H., Martin, K. L. M., Chotkowski, M. A. (Eds). *Intertidal fishes: life in two worlds*. San Diego, Academic Press, 399p.
- Glynn, P. W. 1988. El Niño-Southern Oscillation 1982-1983: nearshore population, community, and ecosystem responses. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 19: 309-345.

- Goyenola, G., Iglesias, C., Mazzeo, N., Jeppesen, E. 2011. Analysis of the reproductive strategy of *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae) with focus on sexual differences in growth, size, and abundance. *Hydrobiologia* 673: 245-257.
- Grove, J. 1985. Influence of the the 1982-1983 El Niño en la esla Galápagos: el evento de 1982-1983. Fundación Charles Darwin, Quito, 191-198.
- Hendry, A. P., Kelly, M. L., Kinnison, M. T., Reznick, D. N. 2006. Parallel evolution of the sexes? Effects of predation and habitat features on the size and shape of wild guppies. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 741-754.
- Herczeg, G., Gonda, A., Merila, J. 2010. Rensch's rule inverted – female-driven gigantism in nine-spined stickleback *Pungitius pungitius*. *Journal of Animal Ecology* 79: 581-588.
- Hochachka, P. W., Somero, G. N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press.
- Hughes, T. P., Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C., Grosberg, R., Hoegh-Guldberg, O., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., Lough, J. M., Marshall, P., Nyström, M., Palumbi, S. R., Pandolfi, J. M., Rosen, B., Roughgarden, J. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301: 929-933.
- Huston, M. A., Wolverton, S. 2011. Regulation of animal size by eNPP, Bergmann's rule, and related phenomena. *Ecological Monographs* 81: 349-405.
- Huyse, T., Houdt, J. V., Volckaert, F. A. 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetic Evolution* 32: 324-36.
- Ingleby, F. C., Lewis, Z., Wedell, N. 2010. Level of sperm competition promotes evolution of male ejaculate allocation patterns in a moth. *Animal Behavior* 80: 37-43.
- Isaac, J. 2005. Potential causes and life-history consequences of sexual size dimorphism in mammals. *Mammal Rev* 35: 101–115.
- Johansson, F., Crowley, P. H., Brodin, T. 2005. Sexual size dimorphism and sex ratios in dragonflies (Odonata). *Biological Journal of the Linnean Society* 86: 507-513.
- Karl, I., Fischer, K. 2008. Why get big in the cold? Towards a solution to a life-history puzzle. *Oecologia* 155: 215-225.
- Kelly, C. D., Folinsbee, K. E., Adams, D. C., Jennions, M. D. 2013. Intraspecific sexual size and shape dimorphism in an australian freshwater fish differs with respect to a biogeographic barrier and latitude. *Journal of Evolutionary Biology* 40: 408-419.
- Kendall, M. G., Stuart, A. 1973. The Advanced Theory of Statistics, volume 2. Charles Green, London.
- Kitano, J., Mori, S., Peichel C. L. 2012. Reduction of sexual dimorphism in stream resident forms of three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal Fish Biology* 80: 136-146.

- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Kratochvíl L., Frynta, D. 2002. Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 303-314.
- Lande, R. 1982. Rapid origin of sexual isolation and character divergence in a cline. *Evolution* 36: 213-223.
- Langerhans, R. B., Layman, C. A., DeWitt, T. J. 2005. Male genital size reflects a trade-off between attracting mates and avoiding predators in two live-bearing fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 7618-7623.
- Langerhans, R. B., Layman, C. A., Shokrollahi, A. M., DeWitt, T. J. 2004. Predator-driven phenotypic diversification in *Gambusia affinis*. *Evolution* 58: 2305-2318.
- Leese, J. M., Snekser, J. L., Ganim, A., Itzkowitz, M. 2009. Assessment and decision making in a Caribbean damselfish: nest-sitequality influences prioritization of court ship and brood defense. *Biology Letters* 5: 198-180.
- Lengkeek, W., Didderen, K., Côté, I. M., van der Zee, E. M., Snoek, R. C., Reynolds, J. D. 2008. Plasticity in sexual size dimorphism and Rensch's rule in Mediterranean blennies (Blenniidae). *Canadian Journal of Zoology* 86: 1173-1178.
- Levene, H. 1960. Robust Tests for Equality of Variances. In: I. Olkin (ed.), *Contributions to Probability and Statistics*, Stanford University. Press 278-292.
- Lima, D., Freitas, J. E. P., Araújo, M. E., Solé-Cava, A. M. 2005. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320: 211-223.
- Lima-Filho, P. A., Cioffi, M. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2012. Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *Journal Experimental Marine Biology Ecology* 43: 63-70.
- Lima-Filho, P. A., Martinez, P. A., Molina, W. F. 2010. Dimorfismo sexual e padrão de variação ontogenética em *Bathygobius soporator* (Valenciennes,1837) (Gobiidae - Perciformes) a partir de análises por morfometria geométrica. 62^a Reunião Anual da SBPC. Resumo 4277.
- Lumpkin, R., Garzoli, S. L. 2005: Near-surface Circulation in the Tropical Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* 52: 495-518.
- Martins, R. F., Nomura, M. N., Hadel, V. F. 2006. Fidelidade de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Pisces: Gobiidae) à poça de maré do Istmo do Baleiro, São Sebastião (SP). In: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, Resumos. Londrina.

- McCormick, M. I., Ryen, C. A., Munday, P. L., Walker, S. P. 2010. Differing mechanisms underlie sexual size-dimorphism in two populations of a sex-changing fish. *Plos One* 5: e10616.
- Mikolajewski, D. J., Joop, G., Wohlfahrt, B. 2007. Coping with predators and food limitation: testing life history theory for sex specific larval development. *Oikos* 116: 642-649.
- Miller, P. J. 1961. Age, growth, and reproduction of the rock goby *Gobius paganellus* L., in the Isle of Man. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 41: 737-769.
- Molina, W. F., Shibatta, O. A., Galetti-Jr, P. M. 2006. Multivariate morphological analyses in continental and island populations of *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus) (Pomacentridae, Perciformes) of Western Atlantic. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences Brasil* 1: 49-56.
- Møller, A. P., Birkhead, T. R. 1994. The evolution of plumage brightness in birds is related to extrapair paternity. *Evolution* 48: 1089-1100.
- Monteiro, L. R., Diniz-Filho, A. F., Reis, S. F., Araújo, E. D. 2002. Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution* 56: 563-572.
- Moore, R. H. 1975. Occurrence of tropical marine fish at Port Aransas, Texas 1967-1973. Relation to sea temperatures. *Copeia* 1975: 170-172.
- Mora, C., Ospína, A. F. 2001. Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology* 139: 765-769.
- Morin, J. P., Moreteau, B., Pétavy, G., David, J. R. 1999. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 329-339.
- Mousseau, T. A. 1997. Ectotherms follow the converse Bergmann's rule. *Evolution* 51:630–632.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Owens, I. P. F., Hartley, I. R. 1998. Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? *Proc R Soc Lond B* 265: 397-407.
- Parker, G. A. 1992. The evolution of sexual size dimorphism in fish. *Journal of Fish Biology* 41: 1–20.
- Parsons, K. J., Beren, W. R., Hrbek, T. 2003. Getting into shape: An empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied to New World cichlids. *Environmental Biology of Fishes* 67: 417-431.
- Quinn, T. P., Wetzel, L., Bishop, S., Overberg, K., Rogers, D. E. 2001. Influence of breeding habitat on bear predation and age at maturity and sexual dimorphism of sockeye salmon populations. *Canadian Journal of Zoology* 79: 1782-1793.
- Qvarnström, A., Forsgren, E. 1998. Should females prefer dominant males? *Tree* 13: 498-501.

- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.
- Raihani, G., Sze'kely, T., Serrano-Meneses, M. A., Pitra, C. Goriup, P. 2006 The influence of sexual selection and male agility on sexual size dimorphism in bustards (Otididae). *Animal Behavior* 71: 833-838.
- Ralls, K. 1977. Sexual dimorphism in mammals: avian models and unanswered questions. *The American Naturalist* 111: 917-938.
- Reimchen, T. E., Nosil, P. 2004. Variable predation regimes predict the evolution of sexual dimorphism in a population of threespine stickleback. *Evolution* 58: 1274-1281.
- Rensch, B. 1950. Die Abhangigkeit der relativen Sexualdifferenz von der Korpergrosse. *Bonner Zoologische Beitrage* 1: 58-69.
- Hernandez-Jimenez A, Rios-Cardenas O. 2012 Natural versus sexual selection: predation risk in relation to body size and sexual ornaments in the green swordtail. *Anim. Behav.* 84, 1051–1059.
- Ritchie, M. G., Hamill, R. M., Graves, J. A., Magurran, A. E., Webb, S. A., Macías, G. C. 2007. Sex and differentiation: population genetic divergence and sexual dimorphism in Mexican goodeid fish. *Journal Evolutionary Biology* 20: 2048-55.
- Robins, C. R., Ray, G. C., 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston.
- Rohlf, F. J., Slice, D. E. 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40–59.
- Rohlf, F. J. 2006. tpsDig version 2.10. Ecology and Evolution, Suny at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Accessed 2012 June 1.
- Rohlf, F. J. 2013. Tps Series. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York. Available: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Accessed 2013 June 8.
- Samia, D. S. M., Møller, A. P., Blumstein, D. T., Stankowich, T., Cooper, W. E. 2015. Sex differences in lizard escape decisions vary with latitude, but not sexual dimorphism. *Proceedings Royal. Society. B.* DOI: 10.1098/rspb.2015.0050.
- Savalli, U. M. 2001. Sexual selection. Pp 207-221 in: Fox, C. F., Roff, D., Fairbairn, D. eds., *Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies*. Oxford University Press.
- Shapiro, S. S., Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for Normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Shine, R. 1989. Ecological Causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *The Quarterly Review of Biology* 64: 419-461.

- Sidlauskas, B. L. Mol, J. H. Vari, R. P. 2011. Dealing with allometry in linear and geometricmorphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. *Zoological Journal of the Linnean Society* 162: 103–130.
- Slatkin, M. 1984. Ecological causes of sexual dimorphism. *Evolution* 38: 622-30.
- Smith, R. J. 1999. Statistics of sexual size dimorphism. *Journal of Human Evolution* 36: 423-459.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1985. *Biometry*. 3rd Edition. W, H, Freeman and Co., New York.
- Somero, G. N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and cost of living. *Integrative and Comparative Biology* 42: 780-789.
- Stillwell, R. C., Fox, C.W. 2007. Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle. *Oecologia* 153: 273-280.
- Stramma, L., England, M. 1999. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. *Journal Geophysical Research Washington* 104: 863-20.
- Stuart-Fox, D. M., Ord, T. J. 2004. Sexual selection, natural selection and the evolution of dimorphic coloration and ornamentation in agamid lizards. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 271: 2249-2255.
- Székely, T., Freckleton, R. P., Reynolds, J. D. 2004. Sexual selection explains Rensch's rule of size dimorphism in shorebirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 12224-12227.
- Tavolga, W. N. 1950. Development of the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Journal of Morphology* 87: 467-492.
- Teder, T., Tammaru, T. 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. *Oikos* 108: 321-334.
- Thacker, C. E. 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 354-368.
- Tsuboi, M., Gonzalez-Voyer, A., Hoglund, J., Kolm, N. 2012. Ecology and mating competition influence sexual dimorphism in Tanganyikan cichlids. *Evolutionary Ecology* 26: 171-185.
- Vooren, C. M., Brusque, L. 1999. Diagnóstico sobre as aves do ambiente costeiro do Brasil. Avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha Pronabio. <http://www.anp.gov.br>. (Acessado em 15/08/2013).
- Walsh, M. R., Reznick, D. N. 2009. Phenotypic diversification across an environmental gradient: a role for predators and resource availability on the evolution of life histories 63: 3201-3213.

- Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S., Taskinen, S. 2012. Smatr 3 - an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 257-259.
- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., Westoby, M. 2006. Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews* 81: 259-291.
- Wilson, J. G. 1981. Temperature tolerance of circatidal bivalves in relation to their distribution. *Journal of Thermal Biology* 6: 279-286.
- Wong, B. B. M., Candolin, U. 2005 How is female mate choice affected by male competition? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 80: 559-571.
- Young, K. A. 2005. Life-history variation and allometry for sexual size dimorphism in Pacific salmon and trout. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 272: 167-172.
- Zar, J. H. 2010. Biostatistical Analysis. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 944pp.

Capítulo 4

Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: darter and emerald Gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae)

Paulo Augusto Lima-Filho^{1,3}, Luiz Antônio Carlos Bertollo², Marcelo de Bello Cioffi², Gideão Wagner Wernek da Costa¹, Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Macau, RN, Brasil.

Artigo publicado na revista Cytogenetic and Genome Research, DOI: 10.1159/000360492

Abstract

Karyotype analyses of the cryptobenthic marine species *Ctenogobius boleosoma* and *C. smaragdus* were performed by means of classical and molecular cytogenetics, including physical mapping of the multigene 18S and 5S rDNA families. *C. boleosoma* has $2n = 44$ chromosomes (2 submetacentrics + 42 acrocentrics; FN = 46) with a single chromosome pair each carrying 18S and 5S ribosomal sites; whereas *C. smaragdus* has $2n = 48$ chromosomes (2 submetacentrics + 46 acrocentrics; FN = 50), also with a single pair bearing 18S rDNA, but extensive increase in the number of GC-rich 5S rDNA sites in 21 chromosome pairs. The highly divergent karyotypes among *Ctenogobius* species contrast with observations in several other marine fish groups, demonstrating an accelerated rate of chromosomal evolution mediated by both chromosomal rearrangements and the extensive dispersion of 5S rDNA sequences in the genome.

Keywords: Fish cytogenetics. Heterochromatinization. Karyotype evolution. Multigene families. Repetitive sequence expansion.

1. Introdução

With around 1,950 species, the family Gobiidae is the largest among marine fishes [Nelson, 2006] and shows significant diversity that appears to be associated with the high rates of speciation in reef and tidal environments [Thacker, 2009]. However, the full extent of this diversity remains largely unknown due to its multiple habitats, wide geographic distribution, small body size (typically <5 cm), and often cryptic ecological patterns. Some species have proved to be favorable diversification models in the marine environment [Ruber et al., 2003; Taylor and Hellberg, 2005], showing population fragmentation even at low geographical scales (<100 km) [Dawson et al., 2002; Taylor and Hellberg, 2003; Rocha et al., 2005].

In contrast to other marine representatives of Perciformes, Gobiidae exhibit higher karyotype diversity [Vasil'ev and Grigoryan, 1993; Caputo et al., 1997; Ene, 2003], making them particularly suitable for studies of genetic structure. In this respect, chromosomal mapping of specific sequences using fluorescence in situ hybridization (FISH), which enhances the detection of homeologous regions in the genomes of different species [reviewed in Cioffi and Bertollo, 2012], is still restricted in Gobiidae [Mandrioli et al., 2001; Ocalewicz and Sapota, 2011] and has only recently been applied in population analyses [Li-With around 1,950 species, the family Gobiidae is the largest among marine fishes [Nelson, 2006] and shows significant diversity that appears to be associated with the high rates of speciation in reef and tidal environments [Thacker, 2009]. However, the full extent of this diversity remains largely unknown due to its multiple habitats, wide geographic distribution, small body size (typically <5 cm), and often cryptic ecological patterns. Some species have proved to be favorable diversification models in the marine environment [Ruber et al., 2003; Taylor and Hellberg, 2005], showing population fragmentation even at low geographical scales (<100 km) [Dawson et al., 2002; Taylor and Hellberg, 2003; Rocha et al., 2005]. In contrast to other marine representatives of Perciformes, Gobiidae exhibit higher karyotype diversity [Vasil'ev and Grigoryan, 1993; Caputo et al., 1997; Ene, 2003], making them particularly suitable for studies of genetic structure. In this respect, chromosomal mapping of specific sequences using fluorescence in situ hybridization (FISH), which enhances the detection of homeologous regions in the genomes of different species [reviewed in Cioffi and Bertollo, 2012], is still restricted in Gobiidae [Mandrioli et al., 2001; Ocalewicz and Sapota, 2011] and has only recently been applied in population analyses [Lima-Filho et al., 2012]. In some fish groups, repetitive sequences have shown abrupt evolutionary modifications, with marked

differentiation even among closely related species [Mantovani et al., 2004; Abel et al., 2006], whereas in other groups they do not seem to play an obvious role in the diversification of the karyotype [Molina, 2007; Motta-Neto et al., 2011].

In general, Gobiidae are benthic dwellers [Depczynski and Bellwood, 2003] and have a broad variation in the pelagic larval phase [Sponaugle and Cowen, 1994] probably related to the complex levels of the population structure [Thacker, 2004]. In fact, the pelagic larval period has proved to be linked with the rate of karyotype diversity in some reef fish families, such as Pomacentridae [Molina and Galetti, 2004] and Labridae [Sena and Molina, 2007].

The Brazilian region comprises 40 recognized species of Gobiidae [Menezes et al., 2003], with cytogenetic data known only for *Bathygobius soporator* [Cipriano et al., 2008; Galvao et al., 2011; Lima-Filho et al., 2012]. It is likely that the real number of species in this family is still underestimated mostly due to species diversity, cryptic taxonomic features and gaps of species inventory in the large ranges of the Brazilian coast. In view of this, chromosomal markers constitute important data for the characterization of the fish biota, providing useful subjects for phylogenomics [Cioffi et al., 2012].

In the present study, 2 small sedentary cryptobenthic species of the *Ctenogobius* genus, which is widely distributed in the estuarine and reef regions from Florida (USA) to southern Brazil [Sinque and Muelbert, 1998; Menezes et al., 2003], were analyzed using classical and molecular cytogenetic methods.

2. Material and Methods

2.1. Specimens, Chromosome Preparation and Banding Procedures

The individuals of *Ctenogobius boleosoma* (Jordan and Gilbert, 1882), the darter goby ($n= 12$; 7δ , 5φ), and of *C. smaragdus* (Valenciennes, 1837), the emerald goby ($n= 6$; 3δ , 3φ), were collected on Buzios beach ($5^{\circ}46' S$, $35^{\circ}12' W$) and the Barra do Cunhau estuary ($6^{\circ}19'15.50'' S$, $35^{\circ}2'29.31'' W$), respectively, at the coast of Rio Grande do Norte (RN) state, in the northeast of Brazil.

Individuals were subjected to in vivo mitotic stimulation overnight by intramuscular inoculation with a complex of bacterial and fungal antigens [Molina et al., 2010]. Mitotic chromosomes were obtained from cell suspensions from the anterior kidney [Gold et al., 1990]. Drops of these suspensions were dripped onto wet slides heated to $60^{\circ}C$. The diploid number was established by analyzing approximately 30 metaphases for each individual after

Giemsa staining. Heterochromatic regions were detected using C-banding [Sumner, 1972]. The chromosomes were also analyzed with the GC-base-specific chromomycin A₃ (CMA₃) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorochromes [Carvalho et al., 2005] in superimposed sequential images of the same metaphase. The major ribosomal sites, the nucleolar organizer regions (NORs), were identified by silver impregnation in accordance with Howell and Black [1980]. The best metaphases were captured on an Olympus TM BX50 microscope, coupled to an Olympus DP70 digital image capturing system, and used to arrange the karyotype. Chromosome morphology was determined according to Levan et al. [1964].

2.2. Probes for Chromosome Hybridization

Two multigene families (5S and 18S rDNA) were isolated from the *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes) genome and used as probes. One probe contained a 5S rDNA repeat copy and included 120 bp of the 5S rRNA encoding gene, as well as 200 bp of the non-transcribed spacer [Martins et al., 2006]. The other probe corresponded to a 1.400 bp segment of the 18S rRNA gene obtained via PCR from nuclear DNA [Cioffi et al., 2009]. The former probe was labeled with biotin-14-dATP, while the latter one was labeled with digoxigenin-11-dUTP, both by nick translation and in accordance with the manufacturer's specifications (Bionick Labelling System, Roche, Mannheim, Germany).

2.3. FISH

Dual-color FISH was performed on mitotic chromosome spreads [Pinkel et al., 1986] using 5S rDNA and 18S rDNA probes. Briefly, the metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 µg/ml) for 1.5 h at 37°C. After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide (pH 7.0), the spreads were incubated in 2. SSC for 4 min at 70°C. Hybridization mixtures containing 100 ng of the denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2. SSC, and 50% formamide (pH 7.0) in a final volume of 30 µl were dropped onto the slides. The hybridization was conducted overnight at 37°C in a 2. SSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out in a shaker (150 rpm) at 37°C in 2. SSC, 50% formamide (pH 7.0) for 15 min, followed by a second wash in 2. SSC for 15 min, and a final wash at room temperature in 4. SSC for 15 min. Signal detection was performed using avidin-FITC (Sigma ®, St. Louis, Mo., USA) for the 5S rDNA probe and antidigoxigenin-

rhodamine (Roche) for the 18S rDNA probe. Chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μ g/ml).

2.4. Image Processing

The slides were screened with an Olympus BX50 epifluorescence microscope and chromosomal plates were captured using CoolSNAP © system Image Pro Plus software, version 4.1 © (Media Cybernetics). A total of 20–30 metaphases were analyzed on each slide, allowing us to confirm the absence of intraindividual differences regarding the aspects investigated.

3. Results

C. boleosoma had a diploid chromosome number of 2n=44 chromosomes and a karyotype composed of 1 pair of submetacentric and 21 pairs of acrocentric chromosomes (FN=46), while *C. smaragdus* had 2n=48 chromosomes with 1 pair of submetacentrics and 23 pairs of acrocentrics (FN=50) (fig. 1a, c). In both species, the AgNORs were located terminally on the p-arm of the submetacentric pair 1 (fig. 1, boxes). C-banding revealed faint heterochromatic segments in the centromeric and terminal regions of several chromosomes in *C. boleosoma*, whereas those of *C. smaragdus* exhibited more conspicuous heterochromatic blocks (fig. 1b, d). In addition to NORs, heterochromatic regions in both species showed a combined CMA 3⁺/DAPI⁻ pattern (fig. 2a, c). Dual-color FISH indicated lack of synteny between 5S and 18S ribosomal units (fig. 2b, d). 18S rDNA probes in both species displayed signals corresponding to the AgNOR sites presente on pair 1 (fig. 2b, d). The 5S rDNA sites were significantly different between species. While *C. boleosoma* showed 5S rDNA sites only in the centromeric region of the acrocentric pair 13, *C. smaragdus* showed an extensive increase in the number of 5S rDNA sites, which were found in the centromeric regions of 21 chromosome pairs (fig. 2b, d).

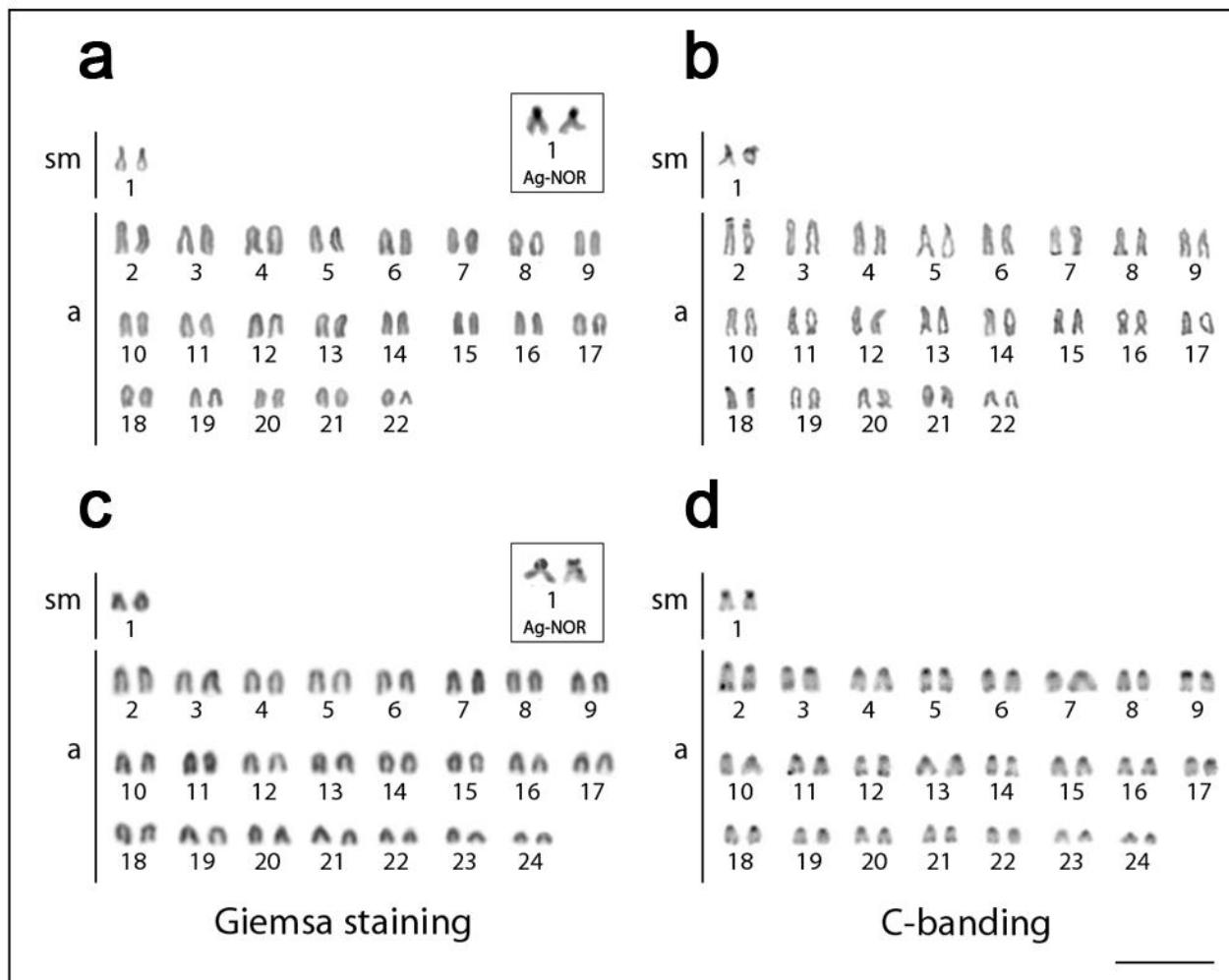


Fig. 1. Karyotypes of *C. boleosoma* (**a, b**) and *C. smaragdus* (**c, d**) after Giemsa staining (**a, c**) and C-banding (**b, d**). The AgNOR-carrying chromosomes are shown in boxes. sm= Submetacentric chromosomes; a= acrocentric chromosomes. Bar= 5 μ m.

4. Discussion

Although a greater level of karyotype similarity is often observed between closely related species [Motta-Neto et al., 2011; Calado et al., 2012], differences in the diploid number between species of the same genus are relatively common among Gobiidae [Thode and Alvarez, 1983; Nayak and Khuda-Bukhsh, 1987; Vasil'ev and Vasil'yeva, 1994]. This level of divergence is also expressed between *C. boleosoma* ($2n=44$; FN=46) and *C. smaragdus* ($2n=48$; FN=50), where differences in chromosomal number and morphology are also accompanied by significant modifications in the frequency of 5S rDNA sites in the karyotype. According to the hypothesized basal karyotype for Gobiidae with $2n=46$ acrocentric chromosomes [Vasil'ev and Grigoryan, 1993], a decrease or increase in

chromosome number, as observed in *C. boleosoma* ($2n=44$) and *C. smaragdus* ($2n=48$), respectively, suggests karyotypes derived by chromosomal rearrangements.

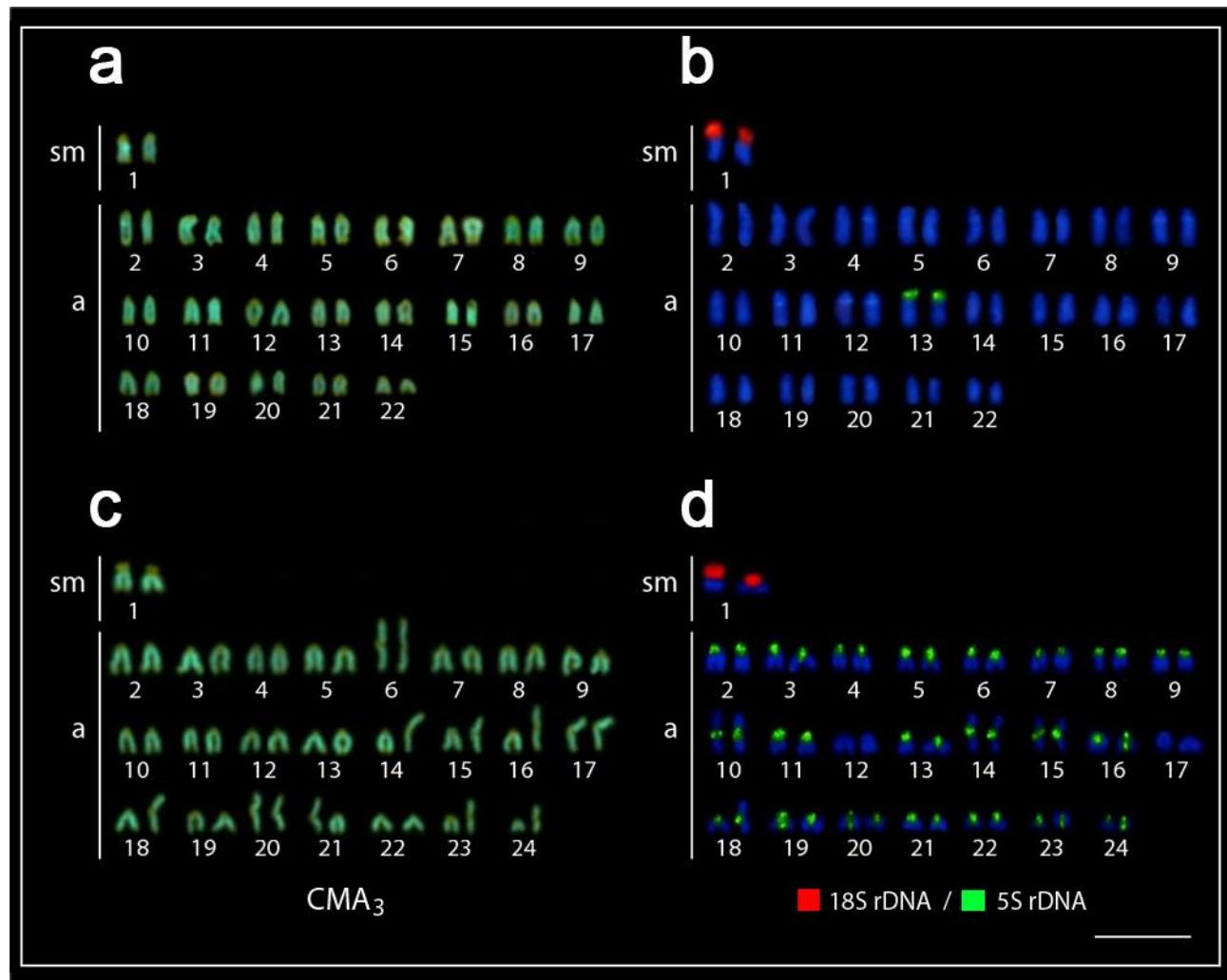


Fig. 2. Karyotypes of *C. boleosoma* (**a, b**) and *C. smaragdus* (**c, d**) after CMA₃/DAPI staining (**a, c**) and dualcolor FISH with 18S (red) and 5S (green) rDNA probes (**b, d**). Note the occurrence of GC-positive sites in the centromeric and terminal regions of most chromosomes in both species, as well as the significant increase of 5S rDNA sites in *C. smaragdus*. sm= Submetacentric chromosomes; a= acrocentric chromosomes. Bar = 5 μ m.

Indeed, the Gobiidae family exhibits highly dynamics karyotypes in terms of chromosome number and morphology [e.g. Galvão et al., 2011], in contrast to the conserved pattern displayed by several other perciform groups [Molina, 2007]. Evidence of this evolutionary dynamism is supported by a high degree of polymorphism caused by Robertsonian translocations, tandem fusions and pericentric inversions [Giles et al., 1985; Thode et al., 1985; Amores et al., 1990; Caputo et al., 1999; Ene, 2003], demonstrating different processes involved in the origin of the diverging karyotypes. Among *Ctenogobius*

karyotypes, chromosomal fusions have been suggested as common events in karyotype divergence within this genus [Thode et al., 1988; Galetti et al., 2000; Ene, 2003]. In fact, in *C. boleosoma*, tandem fusions appear to have promoted the decrease in diploid number when compared with *C. smaragdus*. However, in other species of this genus, such as *C. criniger*, chromosomal fissions and pericentric inversions are hypothesized to be responsible for the increase of the diploid number to $2n=50$ (34 meta-/submetacentrics + 6 subtelocentrics + 10 acrocentrics) and the substantial amount of bi-armed elements in the karyotype [Arai and Sawada, 1974]. The extensive changes in karyotype structure in species of this genus must have played a role in the reorganization of coadapted gene complexes. An example of this is the emergence of a multiple system of sex chromosomes X1X1X2X2/X1X2Y ($2n=48$ in females, $2n=47$ in males) in *C. shufeldti*, caused by Robertsonian translocation [Pezold, 1984]. Thus, the species of the genus *Ctenogobius* present a strong evolutionary dynamism modeled by different chromosomal rearrangements, such as pericentric inversions, fusions and fissions. Although the causes of the significant karyotype diversity in this group are not yet well-understood, they may probably be related to population fragmentation, as already cytogenetically identified for some species [Caputo, 1998; Lima-Filho et al., 2012], enabling the creation of effective post-zygotic barriers.

The numerical and morphological diversity of diploid karyotypes in Gobiidae is not always accompanied by equivalent differentiation in the heterochromatic regions [Galvao et al., 2011]. Nevertheless, heterochromatin heterogeneity has been identified in several species from this family, including *Gobius paganellus*, *G. niger*, *G. cobitis*, and *Zosterisessor ophiocephalus* [Caputo et al., 1997; Canapa et al., 2002]. GC-rich heterochromatin, located in the centromeric and terminal regions of chromosomes in *C. boleosoma* and *C. smaragdus*, also occurs in most 1- and 2-armed chromosomes in another species of Gobiidae, *Neogobius eurycephalus*. This species exhibits numerical chromosomal polymorphism, with karyotypes containing $2n=30$, 31 and 32 chromosomes and the same number of chromosomal arms (FN=46), resulting from multiple fusions between monobrachial elements [Ene, 2003]. There is increasing evidence emphasizing the role of the subtelomeric regions, with a concentration of duplications flanked by telomeric repeats, as hotspots for interchromosomal recombination and duplication [Linardopoulou et al., 2005]. Due to more recent changes, most subtelomeric duplications in humans show variations in the position and number of copies between populations [Rudd et al., 2009]. In plants, indirect evidence of ectopic recombination has been found through FISH analyses involving satellite DNA in the subtelomeric regions of nonhomologous chromosomes [Gonzalez-Garcia et al., 2006]. The widespread presence of

GC-rich sequences in the terminal regions of most chromosomes in *C. smaragdus* may be related to the dispersion and homogenization of GC-rich/5S rDNA sequences in the genome of this species. In fact, GC-rich regions are more prone to high recombination rates [Hastie and Allshire, 1989]. As such, if ectopic recombination events occurred in *C. smaragdus*, it would promote the dispersion of sequence copies to physically distinct sites, such as those observed in the chromosomes of this species. In this case, the more conspicuous pattern of C-bands found in *C. smaragdus* may be the result of subsequent tandem duplication events, amplifying these sequences in the chromosomes. The similarity of these regions (C+/GC+/5S rDNA) suggests that this dispersion event may have occurred rapidly and sequentially. However, this proposal leaves one unanswered question: why is this remarkable dispersion event unique to *C. smaragdus*, since the same abundance in GC-rich sites is evident in *C. boleosoma*, which does not display this characteristic?

In turn, we cannot rule out the involvement of transposable elements (TEs) in this dispersion event, as observed in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae), where there is a close association between *Rex3* retrotransposon and 5S rDNA sites widely distributed in the karyotype [Cioffi et al., 2010]. Several studies have suggested that the rDNA may represent ideal sites for the survival of TEs [Raskina et al., 2004, 2008; Zhang et al., 2008] and that TEs are probably related with rDNA movement [Kalendar et al., 2008], as well as other genes [Venner et al., 2009], inside the genome.

Several adaptive conditions with significant evolutionary relevance are linked to the loss and gain of repetitive sequences in the karyotype. The differentiation of sex chromosome systems [Cioffi et al., 2012], leading to postzygotic reproductive barriers, and variations in intrapopulational morphological patterns [Molina et al., 2008] are adaptive roles that extrapolate the neutral internal conditions of the karyotype. The rapid dispersion of specific sequences over a short time period may also be an importante evolutionary mechanism linked to adaptive advantages (e.g. resistance genes) [David et al., 2009] providing new bases for karyotype differentiation in the species. However, the biological significance of multiple 5S sequences in *C. smaragdus* is still an open question.

Our data provides evidence that the chromosomal evolution of *Ctenogobius* species is mediated by both chromosomal rearrangements (pericentric inversions, tandem fusions and fissions) and the apparently rapid and extensive dispersion of 5S rDNA sequences in the karyotype. Such diverse levels of chromosomal evolution in comparison with other Perciformes [Molina, 2007] make this order, and the family Gobiidae in particular, an

excellent model for better understanding the evolutionary mechanisms underlying the significant genome diversity found among fishes.

5. References

- Abel LDS, Mantovani M, Moreira-Filho O: Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Gen Mol Biol* 29: 448–452 (2006).
- Amores A, Giles V, Thode G, Alvarez MC: Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* 65: 151–155 (1990).
- Arai R, Sawada Y: Chromosomes of Japanese gobioid fishes. *Bull Nat Sci Mus Tokyo* 17: 97–105 (1974).
- Calado LL, Bertollo LAC, Costa GWWF, Molina WF: Cytogenetic studies of Atlantic mojarras (Perciformes – Gerreidae): chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH. *Aquac Res* 44: 829–835 (2012).
- Canapa A, Cerioni PN, Barucca M, Olmo E, Caputo V: A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Res* 10: 297–304 (2002).
- Caputo V: Nucleolar organizer (NOR) location and cytotoxic implications in six species of gobiid fishes (Perciformes, Gobiidae). *Ital J Zool* 65: 93–99 (1998).
- Caputo V, Marchegiani F, Sorice M, Olmo E: Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenet Cell Genet* 79: 266–271 (1997).
- Caputo V, Caniglia ML, Machella N: The chromosomal complement of *Aphia minuta*, a paedomorphic goby. *J Fish Biol* 55: 455–458 (1999).
- Carvalho R, Soares-Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M: The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109: 276–282 (2005).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Genome Dyn* 7: 197–221 (2012).
- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC: Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res* 125: 132–141 (2009).
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC: Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol* 10: 271 (2010).
- Cioffi MB, Molina WF, Artoni RF, Bertollo LAC: Chromosomes as tools for discovering

biodiversity – the case of Erythrinidae fish family, in Tirunilai P (ed): Recent Trends in Cytogenetic Studies – Methodologies and Applications (InTech Publisher, Rijeka 2012). <http://www.intechopen.com/doi:10.5772/35890>.

Cipriano RR, Fenocchio AS, Artoni RF, Molina W, Noleto RB, et al: Chromosomal studies of five species of the marine fishes from the Paranagua Bay and the karyotypic diversity in the marine Teleostei of the Brazilian coast.

Braz Arch Biol Technol 51: 303–314 (2008). David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A, Thareau V, Sevignac M, et al: A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. Plant Physiol 151: 1048–1065 (2009).

Dawson MN, Louie KD, Barlow M, Jacobs DK, Swift CC: Comparative phylogeography of sympatric sister species, *Clevelandia ios* and *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei: Gobiidae), across the California transition zone. Mol Ecol 11: 1065–1075 (2002).

Depczynski M, Bellwood DR: The role of cryptobenthic reef fishes in coral reef trophodynamics. Mar Ecol Prog Ser 256: 183–191 (2003).

Ene AC: Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). Mar Biol 142: 583–588 (2003).

Galetti PM Jr, Aguilar CT, Molina WF: An overview on marine fish cytogenetics. Hydrobiologia 420: 55–62 (2000).

Galvao TB, Bertollo LAC, Molina WF: Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). Comp Cytogenet 5: 259–275 (2011).

Giles V, Thode G, Alvarez MC: A new Robertsonian fusion in the multiple chromosome polymorphism of a Mediterranean population of *Gobius paganellus* (Gobiidae, Perciformes). Heredity 55: 255–260 (1985).

Gold JR, Li C, Shipley NS, Powers PK: Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. J Fish Biol 37: 563–575 (1990).

Gonzalez-Garcia M, Gonzalez-Sanchez M, Puertas MJ: The high variability of subtelomeric heterochromatin and connections between nonhomologous chromosomes, suggest frequente ectopic recombination in rye meiocytes. Cytogenet Genome Res 115: 179–185 (2006).

Hastie ND, Allshire RC: Human telomeres: fusion and interstitial sites. Trends Genet 5: 326–331 (1989).

Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014–1015 (1980).

Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, et al: Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. Proc Natl Acad Sci USA 105: 5833–5838 (2008).

- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220 (1964).
- Lima-Filho PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF: Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol* 43: 63–70 (2012).
- Linardopoulou EV, Williams EM, Fan YX, Friedman C, Young JM, Trask BJ: Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 437: 94–100 (2005).
- Mandrioli M, Manicardi GC, Machella N, Caputo V: Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica* 110: 73–78 (2001).
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira- Filho O: Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genet Mol Biol* 27: 536–542 (2004).
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr: A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133–141 (2006).
- Menezes NA, Buckup PA, Figueiredo JL, Moura RL: Catalogo das especies de peixes marinhos do Brasil. Sao Paulo, Brazil, Museu de Zoologia da Universidade de Sao Paulo (2003).
- Molina WF: Chromosomal changes and stasis in marine fish groups, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): *Fish Cytogenetics*, pp 69–110 (Science Publishers, Enfield 2007).
- Molina WF, Galetti PM Jr: Karyotypic changes associated to the dispersive potential on Pomacentridae (Pisces, Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol* 309: 109–119 (2004).
- Molina WF, Shibatta OA, Galetti PM Jr: Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Parana River basin. *Genet Mol Biol* 31: 270–274 (2008).
- Molina WF, Alves DEO, Araujo WC, Martinez PA, Silva MF, Costa GW: Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genet Mol Res* 9: 1807–1814 (2010).
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF: Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol* 401: 75–79 (2011).
- Nayak K, Khuda-Bukhsh AR: Chromosomes of two species of fishes *Apocryptes* (Gobiidae: Pisces). *Environ Ecol* 5: 371–373 (1987).
- Nelson JS: *Fishes of the World* (John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2006).
- Ocalewicz K, Sapota MR: Cytogenetic characteristics of the round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) (Teleostei: Gobiidae: Benthophilinae). *Mar Biol Res* 7:

- 195–201 (2011).
- Pezold F: Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldti* (Pisces: Gobiidae). *Copeia* 1: 235–238 (1984).
- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938 (1986).
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E: Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA clusters variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14818–14823 (2004).
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A: Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120: 351–357(2008).
- Rocha LA, Robertson DR, Rocha CR, Van Tassell JL, Craig MT, Bowen BW: Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Mol Ecol* 14: 3921–3928 (2005).
- Ruber L, Vantassel JL, Zardoya R: Rapid speciation and ecological divergence in the American seven-spined gobies (Gobiidae, Gobiosomatini) inferred from a molecular phylogeny. *Evolution* 57: 1584–1598 (2003).
- Rudd MK, Endicott RM, Friedman C, Walker M, Young JM, et al: Comparative sequence analysis of primate subtelomeres originating from a chromosome fission event. *Genome Res* 19:33–41 (2009).
- Sena DCS, Molina WF: Robertsonian rearrangements and pericentric inversions in Scaridae fish (Perciformes). *Genet Mol Res* 6: 575–580 (2007).
- Sinque C, Muelbert JH: Ictioplancton, in Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (eds): Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil, pp 56–60 (Editora Ecocientia, Rio Grande 1998).
- Sponaugle S, Cowen RK: Larval durations and recruitment patterns of two Caribbean gobies (Gobiidae): contrasting early life histories in demersal spawners. *Mar Biol* 120: 133–143 (1994).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306 (1972).
- Taylor MS, Hellberg ME: Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299: 107–109 (2003).
- Taylor MS, Hellberg ME: Marine radiations at small geographic scales: speciation in neotropical reef gobies (*Elacatinus*). *Evolution* 59: 374–385 (2005).
- Thacker CE: Population structure in two species of the reef goby *Gnatholepis* (Teleostei: Perciformes) among four South Pacific island groups. *Coral Reefs* 23: 357–366 (2004).

- Thacker CE: Phylogeny of Gobiodei and placement within Acanthomorpha, with a new classification and investigation of diversification and character evolution. *Copeia* 1: 93–104 (2009).
- Thode G, Alvarez MC: The chromosome complements of two species of *Gobius* (Teleostei, Perciformes). *Experientia* 39: 1312–1314 (1983).
- Thode G, Giles V, Alvarez MC: Multiple chromosome polymorphism in *Gobius paganellus* (Teleostei, Perciformes). *Heredity* 54: 3–7 (1985).
- Thode G, Martinez G, Ruiz JL, Lopez JR: A complex chromosomal polymorphism in *Gobius fallax* (Gobiidae, Perciformes). *Genetica* 76:65–71 (1988).
- Vasil'ev VP, Grigoryan KA: Karyology of the Gobiidae. *J Ichthyol* 33: 1–16 (1993).
- Vasil'ev VP, Vasil'yeva ED: The new systematics of freshwater Caucasian gobies: three distinct species within former *N. platyrostris constructor* (Gobiidae), p 66. VIII Congr Soc EuropIchthyol, Oviedo (1994).
- Venner S, Feschotte C, Biemont C: Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. *Trends Genet* 25: 317–323 (2009).
- Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH: Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 180: 1617–1626 (2008).

Capítulo 5

Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Gobionellus oceanicus* and *Gobionellus stomatus* (Gobiidae: Perciformes): a shared XX/XY system and an unusual uneven distribution of 5S rDNA sites on the Y chromosome

Paulo Augusto Lima-Filho^{1,3}, Karlla Danielle Jorge Amorim¹, Marcelo de Bello Cioffi², Luiz Antônio Carlos Bertollo², Gideão Wagner Wernek da Costa¹, Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil.

² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Macau, RN, Brasil.

Artigo aceito para publicação na revista Cytogenetic and Genome Research, DOI: 10.1159/000373909

Abstract

The Gobiidae family is the most specious of the vertebrates, with nearly 2000 species. This high level of speciation is accompanied by conspicuous karyotypic modifications, where the role of repetitive sequences remains largely unknown. This study analyzed the karyotype of two species of the *Gobionellus* genus and mapped 18S and 5S ribosomal genes and microsatellite sequences (CA)₁₅ onto their chromosomes. *Gobionellus oceanicus* (2n=56; ♂ 12m+5st+39a; ♀ 12m+6st+38a) and *G. stomatus* (2n=56; ♂ 20m+15st+21a; ♀ 20m+16sm+20a) possessed the highest 2n among the Gobiidae, and different karyotypes. Both species share a XX/XY sex chromosome system, where the X chromosome is a large subtelocentric and the Y is a small acrocentric, rich in (CA)₁₅ sequences and bearing 5S rRNA sites. Although coding and noncoding repetitive DNA sequences may be involved in the genesis or differentiation of sex chromosomes, the exclusive presence of 5S rDNA sites on the Y chromosome of both species represents a novelty in fishes. In summary, the karyotypic differences, as well as new reports of sex chromosome systems in these two Gobiidae species, confirm the high chromosomal dynamism observed in this family.

Keywords: Gobies. Chromosome differentiation. Molecular cytogenetics. Sex chromosomes.

1. Introduction

The Gobiidae family contains around two thousand presently recognized species [Nelson, 2006; WoRMS, 2014], characterized by conspicuous morphological diversity, likely associated with high speciation rates in reef and tidal environments [Thacker, 2003]. However, it is possible that the real number of species in this family is still underestimated mostly due to species diversity, cryptic taxonomic features and gaps of species inventory. In view of this, chromosomal markers constitute important data for the characterization of the fish biota, providing useful subjects for cyt taxonomy.

In Gobiidae, the $2n$ widely vary within this family, ranging from $2n=30$, in *Mesogobius batrachocephalus* [Ivanov, 1975], to $2n=56$, in *Gobionellus microdon* [Uribe-Alcocer and Diaz-Jaimes, 1996]. Such remarkable karyotypic diversity in this group [Vasil'ev and Grigoryan, 1993; Galvão et al., 2011; Lima-Filho et al., 2014] reveals the participation of different chromosomal rearrangements, strongly contrasting with the conserved pattern present in numerous families of the order Perciformes [Molina, 2007; Motta-Neto et al., 2011; Calado et al., 2013]. This evolutionary dynamism includes a high degree of polymorphisms associated with Robertsonian translocations, tandem fusions and pericentric inversions [Giles et al., 1985; Thode et al., 1985; Amores et al., 1990; Caputo et al., 1997; Ene, 2003], as well as interspecific karyotypic diversifications [Lee et al., 1987], especially with significant variations in the content of repetitive sequences among species [Lima-Filho et al., 2014].

However, despite this dynamism, records of differentiated sex chromosomes are scarce within the family [Arai, 2011], making it particularly interesting in studies on the origin of heteromorphic sex chromosomes. Sex chromosomes evolve from autosomes, which, over time, differ in their structure and gene composition [Charlesworth et al., 2005]. The processes associated with the origin and differentiation of sex chromosomes have awoken considerable interest, especially for fishes, owing to the high diversity of sex-determining mechanisms exhibited by this group [Devlin and Nagahama, 2002]. In contrast with other groups of vertebrates, fishes' sex chromosomes often have independent origins [Nanda et al., 2000; Devlin and Nagahama, 2002; Cioffi et al., 2013], although they may also be shared by a small portion of one clade [Galetti et al., 1995] or nearly entire clades [Artoni and Bertollo, 2002; Vicari et al., 2008].

Heterochromatinization processes have often been associated with the origin of heteromorphic sex chromosome systems in fishes [Nanda et al., 1990; 2002; Vicari et al., 2010; reviewed in Cioffi and Bertollo, 2012]. However, the recent use of *in situ* mapping has

allowed to qualitatively show the participation of coding or noncoding repetitive sequences in the process of sex chromosome differentiation, both at initial stages [Harvey et al., 2002] and in systems already highly differentiated [Machado et al., 2011; Cioffi et al., 2013; Parise-Maltempi et al., 2013].

In the present study two Atlantic species of the genus *Gobionellus* (*G. oceanicus* and *G. stomatus*) were investigated using conventional and molecular cytogenetic techniques, to find useful new characteristics for their comparative genomics at the chromosomal level and to contribute to the knowledge of the XX/XY sex chromosome system present in both species.

2. Material and methods

2.1. Specimens, chromosome preparation and banding protocols

Individuals of *Gobionellus oceanicus* (Pallas, 1770) (n=16; 7♂/9♀) and *G. stomatus* Starks, 1913 (n=10; 5♂/5♀) were collected at Barra do Cunhaú (6°12'37.52"S, 35°8'22.59"W), on the coast of Rio Grande do Norte state, Northeastern Brazil.

Individuals were submitted to *in vivo* mitotic stimulation, using intraperitoneal and intramuscular inoculation of the bacterial and fungal antigen complex [Molina, 2001; Molina et al., 2010]. Mitotic chromosomes were prepared from the suspension of anterior kidney cells [Gold et al., 1990]. Chromosomes were stained with 5% Giemsa, diluted in phosphate buffer (pH 6.8) and the 2n was determined by analyzing around thirty metaphases for each specimen. The heterochromatic regions and ribosomal sites were visualized by C-banding [Sumner, 1972] and the Nucleolar Organizer Regions by silver impregnation (Ag-NORs) [Howell and Black, 1980], respectively.

2.2. Probes and chromosome hybridization procedures

Mitotic chromosomes of each species were analyzed by FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) [Pinkel et al., 1986] using probes produced by the PCR products from the 5S and 18S rRNA genes amplified with the primers A 5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3' and B 5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC-3' [Pendás et al., 1994], NS1 5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3' and NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3' [White et al., 1990], respectively. The 18S rDNA was labeled with DIG-11-dUTP, and the 5S rDNA probe was labeled with biotin-14-dATP, both by nick translation for dual-color FISH

analysis. The metaphase chromosome slides were incubated with RNase (40 µg/ml) for 1.5 h at 37°C. After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide, slides were incubated in 2xSSC for 4 min at 70°C. Hybridization mixtures containing 100 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2xSSC, and 50% formamide in a final volume of 30 µl were dropped onto the slides, and hybridization was performed overnight at 37°C in a 2xSSC moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 37°C in 2xSSC, 50 % formamide for 15 min, followed by a second wash in 2xSSC (pH 7.0) for 15 min, and a final wash at room temperature in 4xSSC (pH 7.0) for 15 min. Detection of the digoxigenin- and biotin-labeled probes was carried out with Anti-Dig-Rhodamine (Roche) and Avidin-FITC (Sigma), for 18S and 5S rDNA, respectively. The post-hybridization washes were performed in a shaker (150 rpm). The chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 µg/ml).

Additionally, the labeled (CA)₁₅ oligonucleotides were used as probes, and the FISH experiments performed as described in Kubat et al. [2008]. The sequences were directly labeled with Cy3 (Sigma) during synthesis. The denatured probe was applied to the slide, covered with a coverslip, and hybridized for 18 h at 37°C. Slides were then washed twice for 5 min each at room temperature, in 2 X SSC and once for 1 min in 1 X PBS.

2.3. Image processing

The best metaphases were photographed in an OlympusTM BX51 epifluorescence microscope, coupled to an Olympus DP73 digital capture system using CellSens software (Olympus), and used to manufacture the karyotypes. Chromosomes were defined according to the position of the centromere (Levan et al., 1964). To determine the NF value, submetacentric (sm) and subtelocentric (st) chromosomes were considered to have two arms and acrocentric chromosomes a single arm.

3. Results

Both species had 2n=56 chromosomes, but different karyotypes. In *G. oceanicus*, females had 12m+4sm+2st+38a (NF=74) and males 12m+4sm+1st+39a (NF=73) (fig. 1) while in *G. stomatus*, females had 20m+14sm+2st+20a (NF=92) and males 20m+14sm+1st+21a (NF=91) (fig. 2). In both species males had one pair of heteromorphic chromosomes, characteristic of an XX/XY sex chromosome system, being the X chromosome large and subtelocentric, while the Y is small and acrocentric.

In both species C-banding showed a number of more conspicuous heterochromatic segments, mainly in centromeric/pericentromeric regions and, to a lesser extent, in the terminal regions of some chromosomes (fig. 1 and 2). The NORs were located on the short arms of pair 1, m in *G. oceanicus* and on the short arms of pair 14, sm in *G. stomatus*. The X chromosomes exhibited a heterochromatic short arm, while in the Y chromosomes the heterochromatic regions were restricted to centromeric regions and terminal regions of long arm (fig. 1 and 2, highlighted).

Dual-color FISH showed the 18S and 5S rDNA sites in different chromosomal pairs in both species. Indeed, 18S rDNA sites were located on the short arm of m pair No. 1, in *G. oceanicus* and in interstitial position on the long arm of sm pair No. 14, in *G. stomatus* (fig. 3, top). In turn, 5S rDNA sites were located in the terminal position of the short arms of sm pair No. 7 in *G. oceanicus*, while in *G. stomatus* they were in the terminal position of the short arms of a pair No. 24 (fig. 3, top). However, in the males of both species, an additional 5S rDNA site was conspicuously well situated in the terminal position of the short arm of Y chromosomes (fig. 3, top). Microsatellite sequences (CA)₁₅ showed a remarkable terminal distribution on the chromosomes of both species. On most chromosome pairs of *G. oceanicus*, in addition to this pattern, a relatively frequent interstitial distribution was also observed. Among autosomes, the two smallest pairs from the karyotype of *G. oceanicus* (pairs Nos. 26 and 27) and the three smallest from the karyotype of *G. stomatus* (pairs Nos. 25, 26 and 27) showed a significant accumulation of these sequences relatively to their sizes. In the sex chromosomes of both species greater distribution of these sequences was observed on the short arm of X chromosomes, as well as a conspicuous accumulation along the length of the Y chromosome (fig. 3, bottom).

4. Discussion

4.1. Karyotype diversification and sex chromosomes

The *Gobionellus* species under study, *G. oceanicus* and *G. stomatus*, exhibited the highest diploid number until now observed for Gobiidae ($2n=56$) but with a wide variation in the number of chromosomal arms (NF), indicating that centric shifts played a major role in the diversification of their karyotypes. However, a wide variation in $2n$ is relatively common in Gobiidae, even between species of a same genus [Thode et al., 1983; Nayak and Khuda-Bukhsh, 1987; Vasil'ev and Vasil'yeva, 1994].

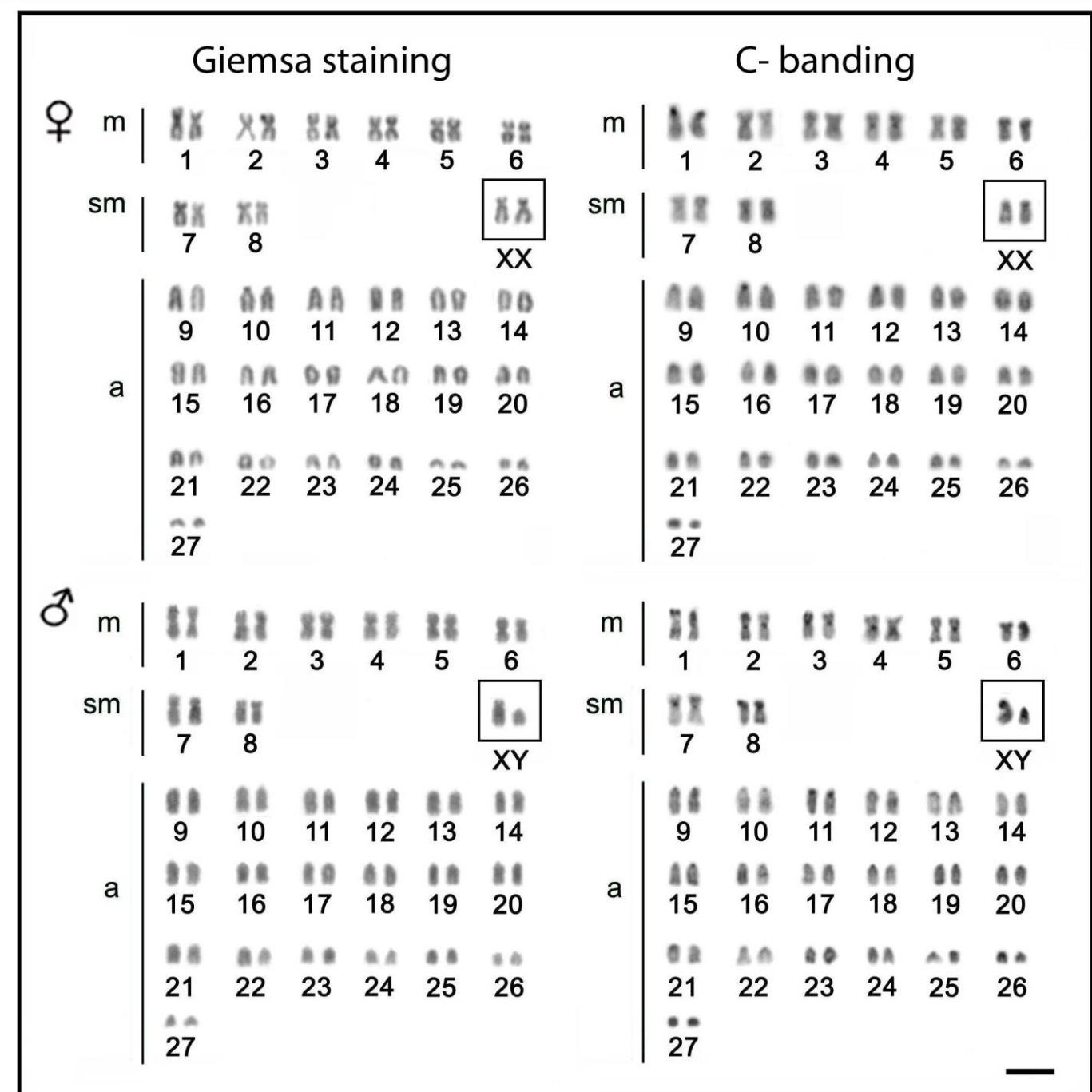


Fig. 1. Female (top) and male (bottom) karyotypes of *Gobionellus oceanicus* arranged from Giemsa-stained (left) and C-banded (right) chromosomes. Sex chromosomes (XY) and Ag-NORs are highlighted in the boxes. Bar equals 5 μ m.

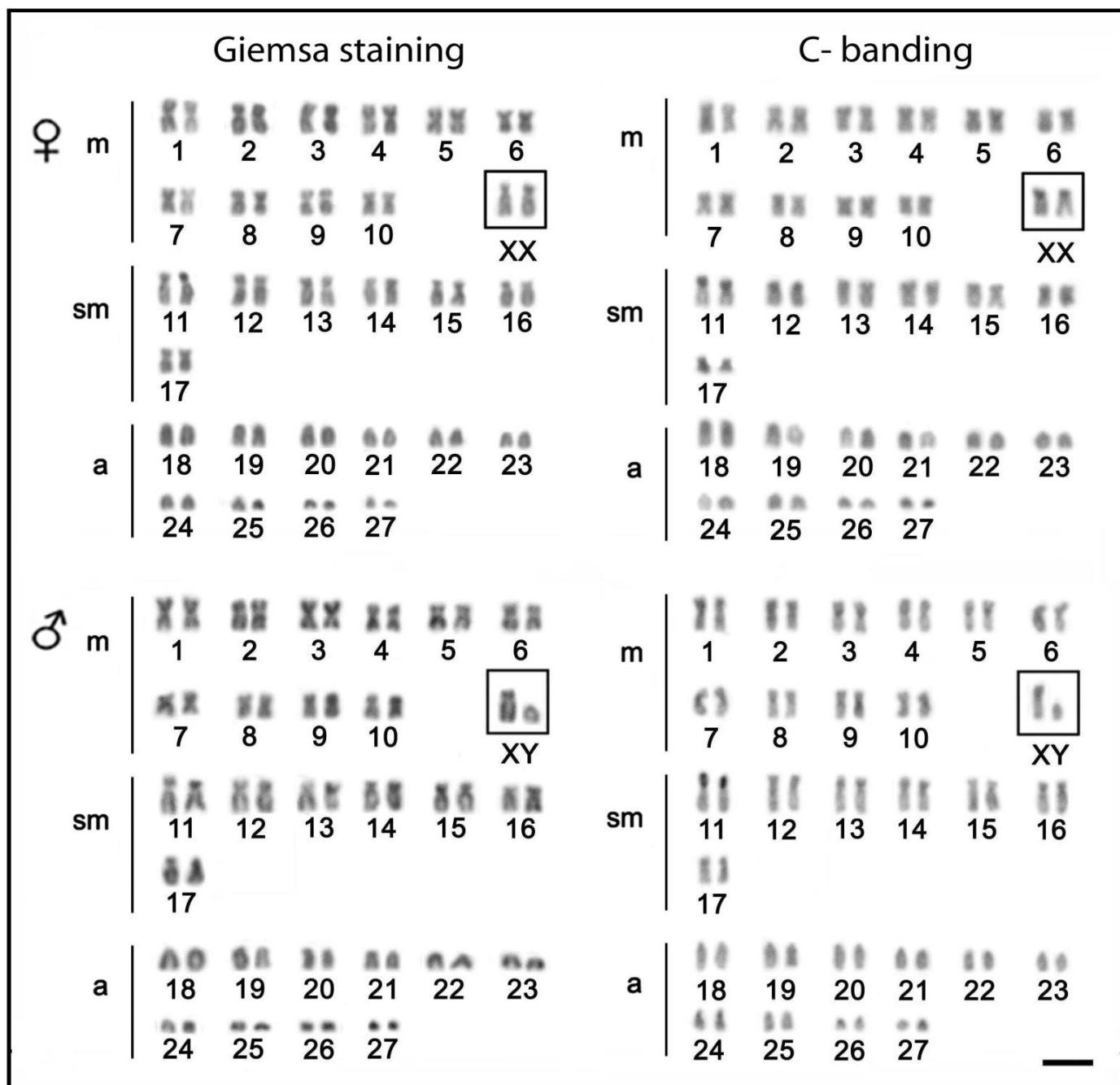


Fig. 2. Female (top) and male (bottom) karyotypes of *Gobionellus stomatus* arranged from Giemsa-stained (left) and C-banding (right) chromosomes. Sex chromosomes (XY) and Ag-NORs are highlighted in the boxes. Bar equals 5 μ m.

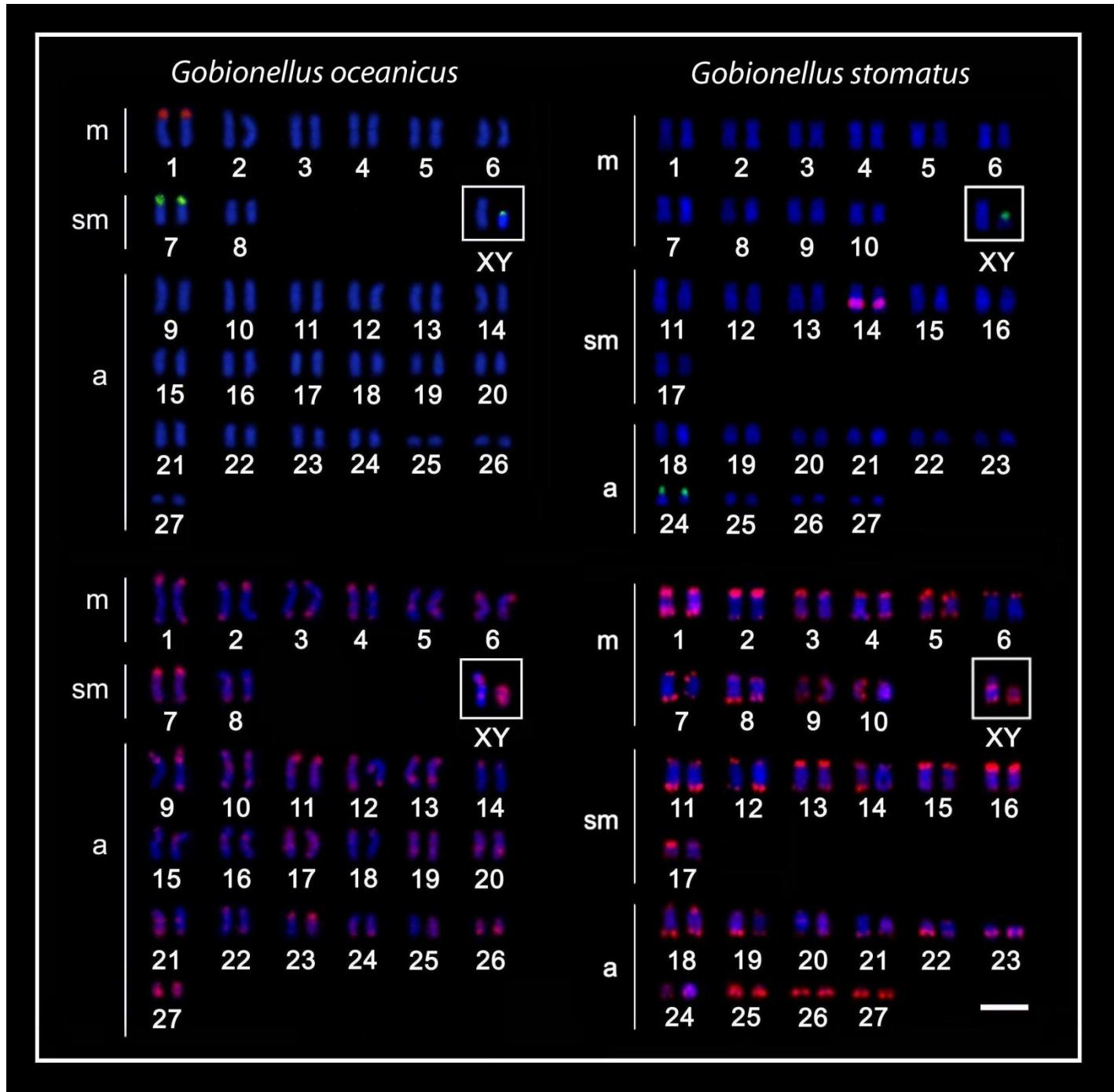


Fig. 3. Male karyotypes of *Gobionellus oceanicus* (left) and *Gobionellus stomatus* (right) arranged from chromosomes after FISH with 18S rDNA (red) and 5S rDNA probes (green) (top) and mapping with microsatellite (CA)₁₅ probes (bottom). A conspicuous 5S rDNA site is located on the short arm of the Y chromosomes of the species. Bar equals 5 μm.

Together with these variations, modifications in the heterochromatic composition and distribution pattern of repetitive sequences in the karyotype were also observed in several gobiid species [Caputo et al., 1997; Lima-Filho et al., 2014]. The propensity for centric fusions and fissions in the genomes of representatives of this family has been tentatively

explained by the occurrence of specific DNA sequences [Canapa et al., 2002], possibly in the centromeres or telomeres, as occurs in other vertebrate groups [Slijepcevic et al., 1997]. Nevertheless, the causes of this high karyotype diversification have not been fully understood. Perhaps, it may be associated with the particular biological characteristics of this fish group, favoring population fractioning and, in some cases, the establishment of effective post-zygotic barriers [Molina, 2007; Lima-Filho et al., 2012].

The occurrence of heteromorphic sex chromosomes is rare in the Gobiidae family. In addition to these two *Gobionellus* species, such system had only been observed in *Ctenogobius shufeldti*, which exhibits a multiple $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ system ($2n=48$, in females and $2n=47$, in males), caused by Robertsonian translocation [Pezold, 1984]. Thus, although they may be related to speciation [Barske and Capel, 2008; Kitano et al., 2009; Kitano and Peichel, 2012], heteromorphic sex chromosome systems do not seem to have significantly contributed to the wide morphological diversification present in this family.

The XX/XY system of *G. oceanicus* and *G. stomatus* is similar in both structure and composition of repetitive elements. The X chromosomes of both species exhibit identical morphology and size, and are markedly different from Y chromosomes, which are also similar in shape and size in each of the species. Furthermore, microsatellite (CA)₁₅ also shows identical distribution between the X chromosomes, as well as between the Y chromosomes. Moreover, in both species, the short arm of Y chromosomes shares an additional 5S rDNA site, exclusive to this chromosome. Although the presence of 5S sites on the Y chromosomes of the two *Gobionellus* species could be due to a common descent. However, although this point needs further conclusive analysis, the sum of all the present characteristics suggests that system has single origin, in contrast to what may occur among other groups of fishes [Cioffi et al., 2010; Cioffi et al., 2013].

4.2. Heterochromatin distribution and rDNA sites in *Gobionellus*

The pattern of GC-rich heterochromatins widely distributed in the centromeric regions of *G. oceanicus* and *G. stomatus* is not common in Perciformes. However, a large number of GC-rich sites were observed in the centromeric and terminal regions of various chromosomes in *Ctenogobius smaragdus* and *C. boleosoma* [Lima-Filho et al., 2014] and previously in *Neogobius eurycephalus* [Ene, 2003]. In the later species, where karyomorphs with $2n=30$, 31 and 32 derived from Robertsonian fusions, the presence of GC-rich sites is a possible promoter of these rearrangements. In some gobies, such as *C. smaragdus* [Lima-Filho et al.,

2014], *Gobius paganellus*, *G. niger*, *G. cobitis* and *Zosterisessor ophiocephalus* [Caputo et al., 1997], it has been suggested that differences in the heterochromatin composition, as exhibited by species of *Gobionellus*, could favor the occurrence and fixation of chromosomal rearrangements.

Ribosomal sites located on one or both sex chromosomes have been identified in different species of fishes [Artoni and Bertollo, 2002; Marquioni et al., 2013], although chromosomes bearing 5S sites are less frequent than those bearing 18S sites. In the rainbow trout, for example, the heteromorphism observed between X and Y chromosomes is due to the presence or absence of 5S rDNA [Phillips et al., 2004]. In the XY system of the catfish (*Liobagrus marginatus*), 5S rDNA sites are located on both X and Y chromosomes, establishing its differentiation by pericentric inversion [Chen et al., 2008].

The presence of an additional 5S site on chromosome Y, in addition to its occurrence on one autosomal pair (pair No. 7 in *G. oceanicus* and pair No. 23 in *G. stomaticus*) could cause an imbalance in the activity of these genes in males. In some cases the variation in the number of 5S sites is a result of the expansion of repetitive sequences associated to these genes in the karyotype, and not directly associated to its increased expression [Lima-Filho et al., 2014]. On the other hand, if these genes are active, they could be evolutionarily maintained by differential regulatory activity in males or ontogenetic expression. In fact, some fish species have two types of 5S rDNA [Martins and Galetti, 2001], in which one is expressed in the oocytes and the other in the somatic cells [Komiya et al., 1986]. In this case, their presence on Y chromosomes would be beneficial if they met the greater transcriptional needs of males or the possible expression during spermatogenesis.

Currently available data concerning the chromosomal mapping of rRNA genes in Gobiidae species has demonstrated the absence of synteny between 45S and 5S subunits [Lima-Filho et al., 2012; 2014]. In some cases extreme dynamism has been identified in 5S rDNA sequences of the karyotype, by the marked divergence in the number of sites between congeneric species [Lima-Filho et al., 2014], allowing the use of these sites as indicators of population variation in a number of species [Lima-Filho et al., 2012]. For species of *Gobionellus*, variations in the positions of ribosomal sites reinforce the intense genomic reorganization that occurred in these species.

Cytogenetic mapping of microsatellite sequences in fishes has increased in recent years [Cioffi et al., 2012], demonstrating, in many cases, preferential accumulation of these sequences in regions of chromosomes such as in centromeres and telomeres [Shimoda et al., 1999; Cioffi et al., 2012]. This is the same pattern that was preferentially observed in the

chromosomes of *G. oceanicus* and *G. stomatus*. However, although (CA)₁₅ dinucleotides have a preferential accumulation in the telomeric regions of other fish species (Cioffi et al., 2012), they were also mapped in the interstitial region of several *G. oceanicus* chromosomes, not entirely shared by *G. stomatus* chromosomes, highlighting the independent genomic diversification that occurred after separation of these species from common ancestor.

Although *G. oceanicus* contains a larger number of acrocentric chromosomes, a condition considered ancestral for Perciformes [Molina, 2007]. The presence of internalized repeats (CA)₁₅, which occur in larger amounts at the terminal positions of chromosomes in these and other species [Cioffi et al., 2011] may indicate derived chromosomes, products of chromosomal fissions of two-armed elements, as described for a number of species of this order [Jacobina et al., 2012].

4.3. Final remarks

Species of the family Gobiidae are characterized by wide numerical and structural karyotype diversity. In addition, the variable distribution of repetitive DNA on chromosomes represents marked processes of genomic diversification that were part of the evolutionary history of this group. However, despite this intense evolutionary dynamic, the incidence of heteromorphic sex chromosomes is particularly low in this family, but may possibly rise with additional cytogenetic investigations of its species. Thus, in view of the current data, the occurrence of a similar XX/XY system, shared by *G. oceanicus* and *G. stomatus*, provides an investigative model on the emergence of sex chromosomes in this group. In contrast to what occurs in some fish families, in which the sex chromosomes exhibit independent origins, shared characteristics between the X and Y chromosomes of these two species, suggest a probable unique evolutionary origin of this sex chromosome system.

5. References

- Amores A, Giles V, Thode G, Alvarez MC: Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* 65:151–155 (1990).
- Arai R: Fish karyotypes A Check List (Springer, Japan 2011).
- Artoni RF, Bertollo LAC: Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A Monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89:15–19 (2002).

- Barske LA, Capel B: Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Curr Opin Genet Dev* 18:499-505 (2008).
- Calado LL, Bertollo LAC, Costa GWWF, Molina WF: Cytogenetic studies of Atlantic mojarras (Perciformes – Gerreidae): chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH. *Aquacult Res* 44:829-835 (2013).
- Canapa A, Cerioni PN, Barucca M, Olmo E, Caputo V: A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Res* 10:297-304 (2002).
- Caputo V, Marchegiani F, Sorice M, Olmo E: Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenet Cell Genet* 79:266–271 (1997).
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G: Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128 (2005).
- Chen J, Fu Y, Xiang D, Zhao G, Long H, Liu J, Yu Q: XX/XY heteromorphic sex chromosome systems in two bullhead catfish species, *Liobagrus marginatus* and *L. styani* (Amblycipitidae, Siluriformes). *Cytogenet Genome Res* 122:169–174 (2008).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Genome Dyn* 7:197-221 (2012).
- Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC: Repetitive DNAs and the differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. *Cytogenet Genome Res* 132:188–194 (2011).
- Cioffi MB, Kejnovský E, Marquoni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, Bertollo LAC: The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogen* 5:28 (2012).
- Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF, Bertollo LAC: Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: a molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenet Genome Res* 141:186-94 (2013).
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC: Differentiation of the XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome. *Sex Dev* 4:176-185 (2010).
- Devlin RH, Nagahama Y: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364 (2002).
- Ene AC: Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Mar Biol* 142:583-588 (2003).
- Galetti Jr. PM, Lima NRW, Venere PC: A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia* 60:375-382 (1995).

- Galvão TB, Bertollo LAC, Molina WF: Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). *Comp Cytogenet* 5:259–275 (2011).
- Giles V, Thode G, Alvarez MC: A new Robertsonian fusion in the multiple chromosome polymorphism of a Mediterranean population of *Gobius paganellus* (Gobiidae, Perciformes). *Heredity* 55:255-260 (1985).
- Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers PK: Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol* 37:563-575 (1990).
- Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LAP, Bromage NR, Penman DJ, Griffin DK: Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes in *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex chromosome differentiation. *Cytogenet Genome Res* 97:76–80 (2002).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer a 1-step method. *Experientia* 36:1014–1015 (1980).
- Ivanov VN: Chromosomes of the Black sea Gobiidae - *Gobius melanostomus* (Pallas) and *Gobius batrachocephalus* (Pallas). *Tsitol Genet* 9:551–552 (1975).
- Jacobina UP, Vicari MR, Bertollo LAC, Molina WF: Discriminatory profile of rDNA sites and trend for acrocentric chromosome formation in the genus *Trachinotus* Lacépède, 1801 (Perciformes, Carangidae). *Comp Cytogen* 6:359–369 (2012).
- Kitano J, Peichel CL: Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environ Biol Fish* 94:549–558 (2012).
- Kitano J, Ross JA, Mori S, Kume M, Jones FC, et al: A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature* 461:1079–1083 (2009).
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E: Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 51:350–356 (2008).
- Lee GY, Jang SI, Yun MJ, So JN: Karyotypes of sixteen species of gobiid fishes from Korea. *Basic Sci Rev* 10:1–14 (1987).
- Levan A, Fredga K, Sandeberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220 (1964).
- Lima-Filho PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF: Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol* 43:63-70 (2012).
- Lima-Filho PA, Bertollo LAC, Cioffi MB, Costa GWWF, Molina WF: Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: darter and emerald gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenet Genome Res* 142:197-203 (2014).
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR: Chromosomal painting and

- ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). BMC Genetics 12:65 (2011).
- Marquioni V, Bertollo LAC, Diniz D, Cioffi MB: Comparative chromosomal mapping in *Triportheus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. Micron 45:129–135 (2013).
- Martins C, Galetti Jr. PM: Two 5S rDNA arrays in neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? Genetica 111:439–446 (2001).
- Molina WF: An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. Chromosome Sci 5:49–152 (2001).
- Molina WF: Chromosome changes and stasis in marine fish groups, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): Fish Cytogenetics, pp 1-52 (Science Publishers Enfield 2007).
- Molina WF, Alves DEO, Araújo WC, Martinez PA, Silva MFM, Costa GWWF: Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. Genet Mol Res 9:1807-1814 (2010).
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF: Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). J Exp Mar Biol Ecol 401:75–79 (2011).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, Epplen JT: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. J Mol Evol 30:456–462 (1990).
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, et al: A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. Proc Natl Acad Sci USA 99:11778–11783 (2002).
- Nanda I, Zend-Ajusch E, Shan Z, Grützner F, Schartl M, et al: Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. Cytogenet Cell Genet 89:67-78 (2000).
- Nayak K, Khuda-Bukhsh AR: Chromosomes of two species of fishes *Apocryptes* (Gobiidae: Pisces). Environ Ecol 5: 371-373 (1987).
- Nelson JS: Fishes of the World (John Wiley and Sons, Inc., New Jersey 2006).
- Parise-Maltempi PP, Silva EL, Rens W, Dearden F, O'brien PCM, Trifonov V, Ferguson-Smith MA: Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. BMC Genetics 14:60 (2013).
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E: Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. Chromosoma 103:147-152 (1994).

- Pezold F: Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldti* (Pisces: Gobiidae). Copeia 1984:235-238 (1984).
- Phillips RB, Noakes MA, Morasch M, Felip A, Thorgaard GH: Does differential selection on the 5S rDNA explain why the rainbow trout sex chromosome heteromorphism is NOT linked to the SEX locus? Cytogenet Genome Res 105:122-125 (2004).
- Pinkel D, Straume T, Gray J: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83:2934-2938 (1986).
- Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E, Kaplan S, Jackson D, Sauvage F, Jacob H, Fishman MC: Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. Genomics 58:219-232 (1999).
- Slijepcevic P, Hande MP, Boufler SD, Lansdorp P, Bryant PE: Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. Chromosoma 106:413-421 (1997).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75:304-306 (1972).
- Thode G, Cano J, Alvarez MC: A karyological study on four species of Mediterranean gobiid fishes. Cytologia. 48:131-138 (1983).
- Thode G, Giles V, Alvarez MC: Multiple chromosome polymorphism in *Gobius paganellus* (Teleostei, Perciformes). Heredity 54:3-7 (1985).
- Tracker CE: Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei). Mol Phylogen Evol 26:354-368 (2003).
- Uribe-Alcocer M, Diaz-Jaimes P: Chromosome complements of *Gobionellus microdon* and *Eleotris picta* collected in Mexico. J Fish Biol 48:796-798 (1996).
- Vasil'ev VP, Grigoryan KA: Karyology of the Gobiidae. J Ichthyol 33:1-16 (1993).
- Vasil'ev VP, Vasil'yeva ED: The new systematics of freshwater Caucasian gobies: three distinct species within former *N. platyrostris* constructor (Gobiidae), p 66. Congr Soc Europ Ichthyol, Oviedo (1994).
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC: Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). Genetica 134:311-317 (2008).
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF: Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. J Fish Biol 76:1094-1116 (2010).
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, pp. 315-322 (Academic Press, Orlando 1990).

WoRMS: Gobiidae, in Froese R, Pauly D (eds) FishBase, Accessed through: World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org>. Accessed 30 May 2014.

Capítulo 6

Aspectos carioevolutivos da família Gobiidae (Perciformes) e descrição citogenética de *Coryphopterus glaucofraenum* e *Evorthodus lyricus*

Paulo Augusto Lima-Filho^{1,2}, Wagner Franco Molina¹

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Macau, RN, Brasil.

Resumo

A família Gobiidae apresenta enorme diversificação no ambiente marinho. Embora as análises citogenéticas sejam ainda limitadas frente à riqueza de espécies existentes, elas já evidenciam uma considerável variação cromossômica numérica e estrutural entre as espécies. Aqui, são reportados aspectos cromossômicos das espécies *Coryphopterus glaucofraenum* e *Evorthodus lyricus*, utilizando procedimentos clássicos. Estas espécies diferem em relação ao número de cromossomos. Enquanto *E. lyricus* exibe $2n=46$ (NF=92), *C. glaucofraenum* apresenta $2n=40$ (NF=42). A variação estrutural observada é principalmente derivada de inversões pericêntricas em *E. lyricus* e possivelmente de fusões em *tandem* em *C. glaucofraenum*. Os dados citogenéticos ora obtidos, associados aos já disponíveis para a família, confirmam uma elevada ocorrência de cariotípos derivados em relação ao padrão cariotípico considerado basal $2n=46$ acrocêntricos, presentes em 84% das espécies analisadas. Observa-se para o grupo uma tendência à fixação de variações preferencialmente do número de braços cromossômicos (NF) em relação ao valor diploide ($2n$), sugerindo para Gobiidae uma dinâmica carioevolutiva semelhante à apresentada por táxons dulcícolas. Nossos dados reforçam a elevada diversidade cariotípica apresentada pelo grupo corroboram a provável relação entre processos especiativos e modificações cromossômicas na diversificação da família.

Palavras-chave: Gobiinae. Gobionellinae. Diversidade cromossômica. Especiação.

1. Introdução

Gobiidae é a família de peixes com maior diversidade no ambiente marinho, com representantes distribuídos nas regiões tropical, subtropical e temperada em habitats costeiros e dulcícolas (Nelson, 2006). Geralmente, os representantes desta família são criptobentônicos, de pequeno porte, que se abrigam em pequenas fendas ou interstícios em corais ou substratos rochosos (Patzer *et al.*, 2012). A grande diversidade presente nos Gobiidae também foi acompanhada por alterações cromossômicas significativas quando comparada a representantes da Ordem Perciformes.

A Ordem Perciformes tem se notabilizado por apresentar uma relativa homogeneidade cromossômica, com pequena porcentagem de seus representantes com números diploides mais elevados ou abaixo do seu número diploide basal de 48 cromossomos acrocêntricos (Molina *et al.*, 2014), mais comumente encontrado entre espécies marinhas do que dulcícolas (Galetti *et al.*, 2000; Molina & Bacurau, 2006, Nirchio *et al.*, 2014). Esta homogeneidade nos representantes marinhos é explicada pela ausência de barreiras físicas bem definidas e, consequentemente, ausência de isolamento geográfico, associados à grande capacidade de dispersão destas espécies (Lacson, 1992; Molina, 2007).

A maior parte dos dados cromossômicos obtidos para gobídeos data das décadas de 70-90, sobretudo em espécies do Indo-Pacífico e Mediterrâneo (Arai, 2011), voltados à determinação de valores diploides e macroestrutura cariotípica (Caputo *et al.*, 1998). Os resultados disponíveis têm permitido identificar diferentes mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica desta família, resultando em padrões cariotípicos derivados (Galvão *et al.*, 2011) com cariótipos variando de $2n=30$ em *Neogobius euricephalus* (Ene, 2003) a $2n=56$ em *Gobionellus microdon* (Uribe-Alcocer & Diaz-Jaimes, 1996). As modificações frequentes e complexas na estrutura cromossônica dos gobídeos podem estar associadas a possíveis modificações da frequência de recombinação e formação de subpopulações cromossomicamente variáveis e incompatíveis, influenciando o rico processo de especiação desse grupo (Caputo, 1998). Apesar do elevado número de descrições cariotípicas em termos absolutos, análises conjuntas destes dados visando distinguir possíveis padrões de diversificação ainda não foram realizadas.

Aqui, são caracterizadas citogeneticamente duas espécies de gobídeos: *Coryphopterus glaucofraenum* Gill, 1863, presente em ambientes recifais e *Evorthodus lyricus* (Girard, 1858), espécie marinha e estuarina, que apresenta ampla distribuição geográfica, dos EUA ao sul do Brasil (Menezes *et al.*, 2003). Adicionalmente, esta sendo apresentada uma revisão

sobre dados cariotípicos numérico e estrutural dos cariotípicos disponíveis para família Gobiidae, estabelecendo uma relação entre diferentes mecanismos de evolução cromossômica no grupo.

2. Material e métodos

Os espécimes de *Coryphopterus glaucofraenum* (n=7; 4♂/3♀) e *Evorthodus lyricus* (n=9; 4♂/5♀) foram coletados no litoral do Rio Grande do Norte, praia de Búzios ($5^{\circ}41'57.41"S$, $35^{\circ}11'34.71"O$) e Barra do Cunhaú ($6^{\circ}19'15.50"S$, $35^{\circ}2'29.31"O$) respectivamente. Os exemplares foram submetidos à estimulação mitótica *in vivo overnight* através de inoculação intramuscular de complexos de抗ígenos bacterianos e fúngicos (Molina, 2001; Molina *et al.*, 2010). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de suspensão de células do rim anterior (Gold *et al.*, 1990). O número diploide foi estabelecido pela análise de cerca de trinta metáfases, coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (pH 6.8). As regiões heterocromáticas foram analisadas através de bandamento C (Sumner, 1972). Os cromossomos foram corados com os fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI (Carvalho *et al.*, 2005). Os sítios ribossomais principais das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram identificados através de impregnação argêntea, de acordo com Howell e Black (1980). As melhores metáfases foram fotografadas em um microscópio OlympusTM BX51, acoplado a um sistema de captura digital Olympus DP73, e utilizadas na confecção dos cariotípicos. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan *et al.* (1964).

Padrões cariotípicos da família Gobiidae foram estimados a partir de dados citogenéticos compilados de Arai (2011), Galvão *et al.* (2011) e artigos presentes em periódicos disponíveis na *World Wide Web*. Um total de 120 espécies pertencentes a cinco subfamílias foram utilizadas nas análises. As variáveis citogenéticas comparadas foram valor diploide (2n) e número de braços cromossômicos (NF), com vistas à identificação da frequência de ocorrência de padrões cromossômicos para o grupo. As espécies que apresentaram acentuado polimorfismo numérico interpopulacional foram suprimidas das análises. Os dados foram transformados segundo o método da padronização (z-score), que os conserva com o valor de tendência central e desvio, média 0 (zero) e variância 1 (um). Análises dos componentes principais (PCA) permitiram investigar tendências de formação de agrupamentos, formular hipóteses baseadas nos resultados de variação nos eixos dos componentes e indicar variáveis de influência relevante. A PCA foi realizada com uso do

pacote estatístico ‘stats’ do software R (R Development Core Team, 2012) para investigar a variação dos parâmetros cariotípicos das espécies em relação às subfamílias e áreas de ocorrência. As espécies foram divididas de acordo com sua distribuição geográfica em quatro grandes grupos, Indo-Pacífico, Pacífico Ocidental, Atlântico Ocidental e Atlântico Oriental (Froese & Pauly, 1999). Foram investigadas as componentes principais que contabilizaram mais que 99% da variação total de dados.

3. Resultados

As análises citogenéticas realizadas em *E. lyricus* e *C. glaucofraenum* indicaram valores diploides e, na macroestrutura cariotípica, inteiramente diferenciados. Enquanto *E. lyricus* apresentou $2n=46$ (24m+22sm, NF= 92), *C. glaucofraenum* apresentou $2n=40$ (2sm+38a, NF=42) (Figura 1). Nesta última espécie, a redução numérica do valor diploide é acompanhada pela ocorrência de pares acrocênicos com tamanhos significativamente maiores que os demais cromossomos do cariótipo.

Em ambas as espécies, os sítios Ag-RONs estão localizados em posição terminal do braço curto de um par cromossômico bobraquial, identificado como o par 2 (metacêntrico) em *E. lyricus* e par 1 (submetacêntrico) em *C. glaucofraenum*. Estes sítios são heterocromáticos e únicas regiões cromossômicas que apresentam padrão de coloração CMA₃⁺/DAPI nos cariótipos. Regiões heterocromáticas são conspícuas e distribuídas em posição terminal na maioria dos cromossomos em *E. lyricus* e reduzidas e localizadas principalmente em regiões centroméricas nos cromossomos de *C. glaucofraenum*.

Análises dos padrões cariotípicos das 120 espécies de Gobiidae, que correspondem a cerca de 6% do total de espécies da família, permitiram a identificação de algumas condições mais frequentes entre os cariótipos analisados. Cariótipos com $2n=44$, representando o valor modal para os Gobiidae, ocorrem em cerca de 35% das espécies; com $2n$ menor que 46 em 33% das espécies e com $2n$ maior que 46 em 16% das espécies, dentre as quais 9% apresentam $2n=48$. Em todas as categorias, existem variações em relação aos tipos de cromossomos, o que pode ser identificado através da extensa faixa de variação do NF (38 a 98), com prevalência de cariótipos com maior número de elementos bobraquiais. Os valores de NF mais frequentes foram 46 (22,5%), 44 (15%) e 48 (5%).

Os representantes da subfamília Gobiinae demonstram valores diploides <46 (42%), 46 (38%) e >46 (18%), NF observado corresponde a <46 (12%), 46 (40%) e >46 (48%). subfamília Gobionellinae apresenta $2n$ <46 (72%), 46 (17%) e >46 (10%), cujo valor modal

nesta categoria são cariótipos com $2n=44$, que correspondem isoladamente a cerca de 53%, NF <46 (25%), 46 (6,3%) e >46 (68%). Com menor valor amostral ($n=15$), Oxudercinae apresenta $2n <46$ (13%), 46 (60%) e >46 (26%), NF <46 (0%), 46 (13%) e >46 (86%).

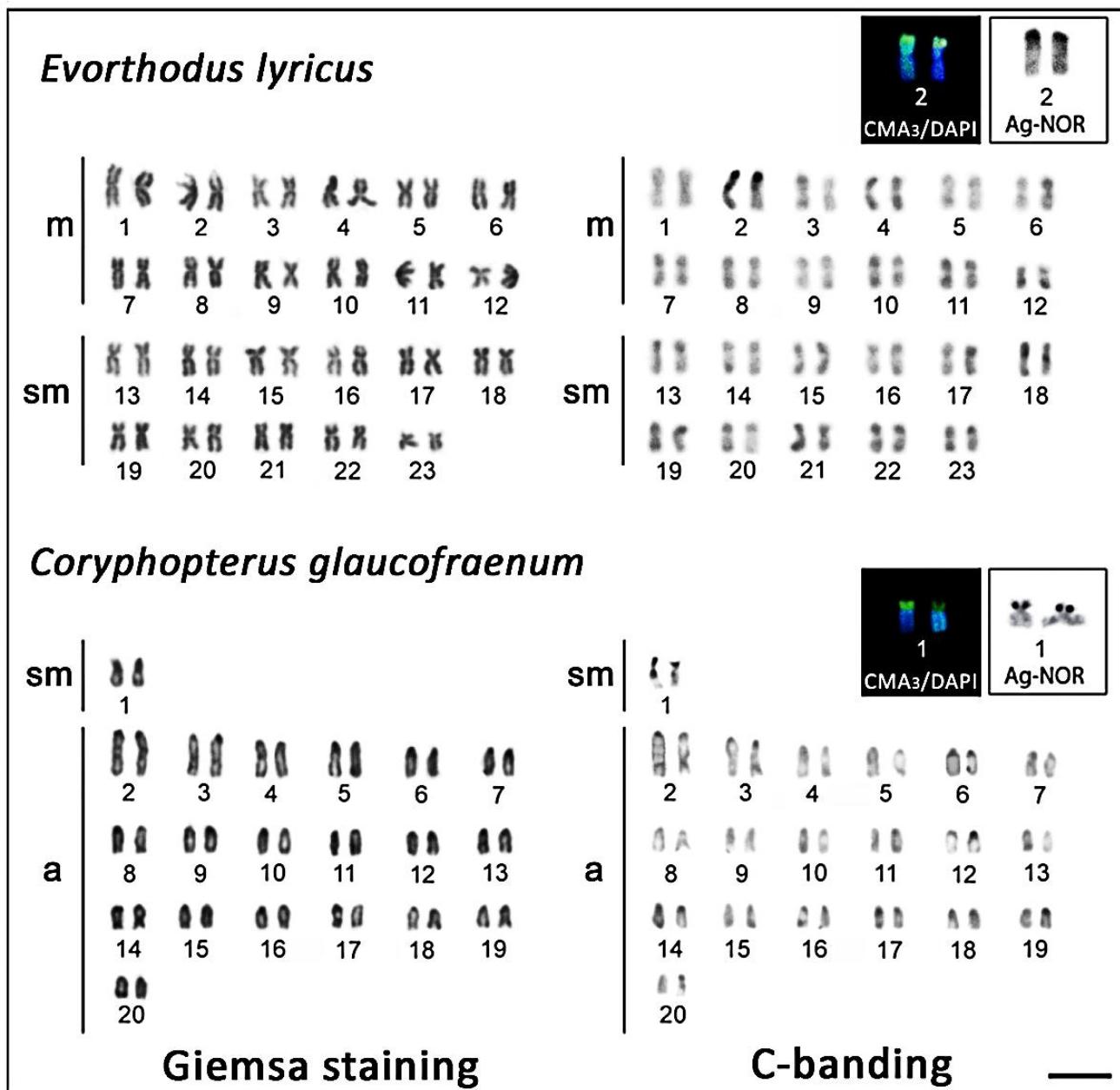


Figura 1. Cariótipos de *C. glaucofraenum* e *E. lyricus* com coloração convencional com Giemsa e bandamento C. Em destaque nas caixas os pares organizadores nucleolares exibindo sítios Ag-RONs e regiões CMA_3^+ /DAPI. Barra=5 μm .

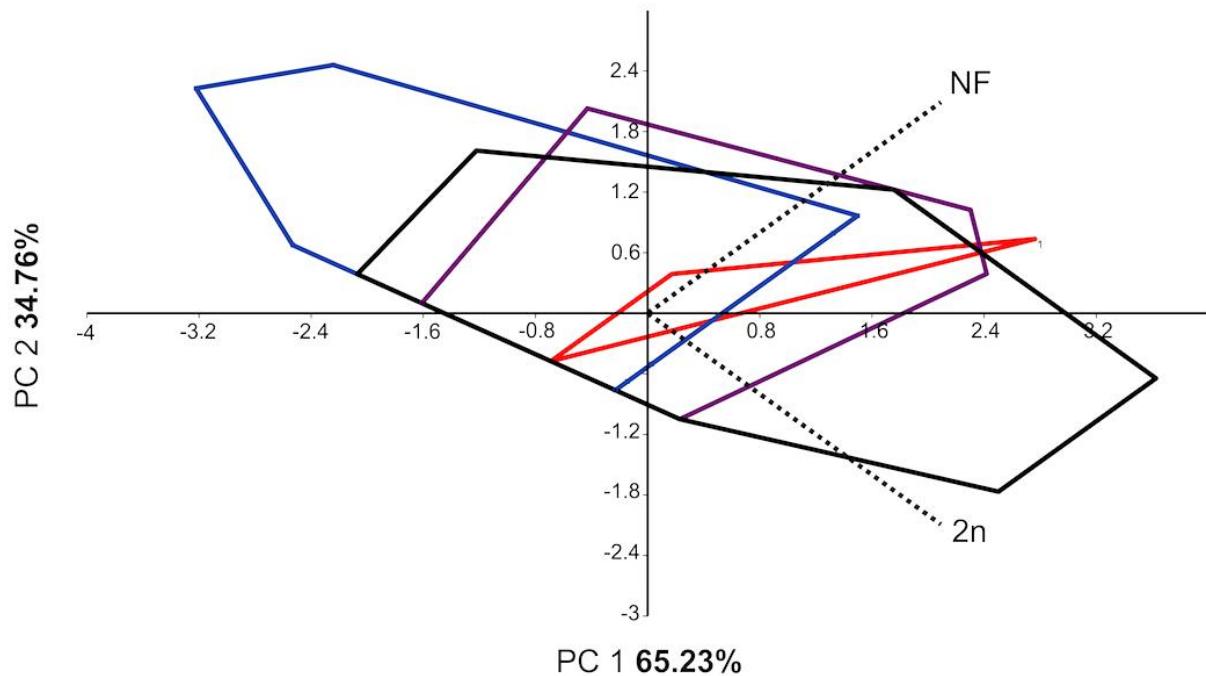


Figura 2. Biplot da análise de componentes principais da relação entre valor diploide ($2n$) e número de braços cromossômicos (NF) com base na classificação das amostras para a distribuição das espécies de Gobiidae: Indo-Pacífico - linha roxa; Atlântico Ocidental - linha preta; Atlântico Oriental - linha azul; Pacífico Ocidental - linha vermelha. Linha tracejada representa a reta de tendência positiva (maior *loading*).

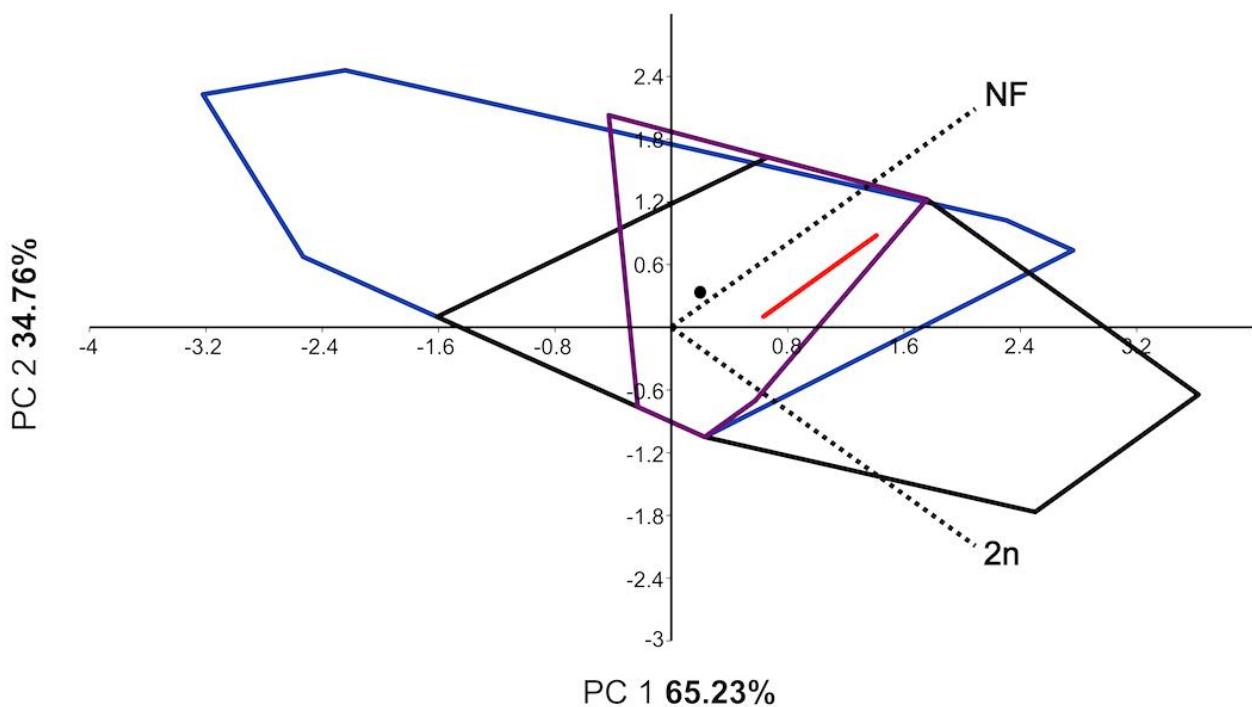


Figura 3. Biplot da análise de componentes principais da relação entre valor diploide ($2n$) e número de braços cromossômicos (NF) a partir da classificação das amostras para as subfamílias de Gobiidae: Oxudercinae - linha roxa; Gobionellinae - linha preta; Gobiinae - linha azul; Amblyopinae - linha vermelha; Sicydiinae - ponto preto. A linha tracejada representa a reta de tendência positiva (maior *loading*).

Análise de Componentes Principais indicou valor comum para PC1=65,23% e PC2=34,76%, em ambos os fatores relacionados (2n e NF em relação à localização das espécies e subfamílias). A partir da observação do agrupamento gerado (Figura 2), foi possível identificar, em todas as regiões geográficas analisadas, uma tendência à variação de NF. Os gobídeos distribuídos na região do Indo-Pacífico possuem uma tendência à variação de NF superior à variação de 2n, tendência semelhante à observada para espécies presentes no Pacífico Ocidental. Espécies distribuídas no Atlântico Ocidental apresentam elevada tendência à variação do valor 2n, enquanto as espécies localizadas no Atlântico Oriental demonstraram menor susceptibilidade à variação de 2n.

O agrupamento identificado visualmente para as subfamílias de Gobiidae pela Análise de Componentes Principais (Figura 3) indicou uma clara tendência à variação de NF para as subfamílias estudadas. Em Gobiinae, observa-se uma tendência à menor variação de 2n, oposta ao indicado para as subfamílias Gobionellinae.

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis da família Gobiidae (Perciformes).

Subfamília/Espécie	2n	Fórmula cariotípica	NF	Referências	Local
Amblyopinae					
<i>Gobiodoides rubicundus</i>	46	2m+26sm+10st+8a	84	Manna & Prasad (1974)	Indo-Pacífico
(<i>Odontamblyopus rubicundus</i>)					
<i>Odontamblyopus rubicundus</i>	46	4m+16sm+26st/a	66	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>Trypauchen vagina</i>	46	12m+6sm+10st+18a	74	Khuda-Bukhsh (1978)	Indo-Pacífico
Oxudercinae					
<i>Apocryptes bato</i>	46	24m+10sm+12a	80	Nayak & Khuda-Bukhsh (1987)	Indo-Pacífico
<i>Apocryptes lanceolatus</i>	38	14m+22sm+2st	76	Nayak & Khuda-Bukhsh (1987)	Indo-Pacífico
(<i>Pseudapocryptes elongatus</i>)					
<i>Apocryptodon madurensis</i>	48			Verma (1968)	Indo-Pacífico
<i>Apocryptodon punctatus</i>	42	24m/sm+18st/a	66	Matsuo (1998)	
<i>Boleophthalmus boddarti</i>	46	46m/sm	92	Subrahmanyam (1969)	Indo-Pacífico
<i>Boleophthalmus dussumieri</i>	46	14m+18sm+14a	78	Khuda-Bukush & Barat (1987)	Indo-Pacífico
<i>Boleophthalmus glaucus</i>	46	12m+20sm+2st+12a	80	Manna & Prasad (1974)	Indo-Pacífico
(<i>Scartelaos cantoris</i>)					
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	46	46st/a	46	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>Periophthalmus borneensis</i>	48			Verma (1968)	Indo-Pacífico
<i>Periophthalmus cantonensis</i>	46	18m+12sm+16st/a	76	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
(<i>Periophthalmus novaeguineaeensis</i>)					
<i>Periophthalmus chrysospilos</i>	56			Matsuo (1998)	Indo-Pacífico
<i>Periophthalmus modestus</i>	46	16m/sm+30a	62	Lee (1986a)	Indo-Pacífico
<i>Periophthalmus schlosseri</i>	46	46a	46	Matsuo (1998)	Indo-Pacífico
<i>Periophthalmus serperaster</i>	46	8m+16sm+4st+18a	74	Khuda-Bukhsh & Nayak (1990)	Indo-Pacífico
<i>Scartelaos histophorus</i>	48	8m/sm+40st/a	56	Matsuo (1998)	Indo-Pacífico
Sicydiinae					
<i>Sicyopterus japonicus</i>	44	10m+10sm+24a	64	Arai & Fujiki (1979)	Indo-Pacífico
Gobiinae					
<i>Acentrogobius pflaumii</i>	50	48m/sm+2st/a	98	Nogusa (1960)	Pacífico Ocidental
<i>Amblygobius albimaculatus</i>	44	2m+42st/a	46	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Amblygobius phalaena</i>	44	2m+24st/a	46	Arai <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Aphia minuta</i> ¹	44	44a	44	Caputo <i>et al.</i> (1999)	Atlântico Oriental
"	42	1m+1st+40a	44	Caputo <i>et al.</i> (1999)	
"	41	2m+1st+38a	44	Caputo <i>et al.</i> (1999)	
<i>Bathygobius fuscus</i>	48	48a	48	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>Bathygobius soporator</i>	48	2m+46a	50	Brum (1996)	Atlântico Oriental
"	2m/sm+46a	50	Cipriano <i>et al.</i> (2002)		
<i>Bathygobius soporator</i>	48	2m+6st+40a	56	Lima-Filho <i>et al.</i> (2012)	Atlântico Ocidental
<i>Bathygobius geminatus</i>	48	2m+4st+42a	54	Lima-Filho <i>et al.</i> (2015)	Atlântico Ocidental
<i>Bathygobius</i> sp.	48	28st+20a	76	Lima-Filho <i>et al.</i> (2012)	Atlântico Ocidental
<i>Benthophilus leobergius</i>	44	2sm+2st+40a	48	Grigoryan & Vasil'ev (1993)	Indo-Pacífico
<i>Benthophilus stellatus</i>	44	2st+42a	46	Grigoryan & Vasil'ev (1993)	Indo-Pacífico
<i>Caspiosoma caspium</i>	48	4sm+30st+14a	82	Grigoryan & Vasil'ev (1993)	Indo-Pacífico
<i>Favonigobius gymnauchen</i>	48	48m/sm	96	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Coryphopterus glaucofraenum</i>	40	2sm+38a	42	Presente estudo	Atlântico Ocidental
<i>Gobiosoma macrodon</i>	38	38a	38	Musammil (1974)	Atlântico Ocidental
(<i>Tigrigobius macrodon</i>)					
<i>Gobiosoma zebrella</i>	38	38a	38	Musammil (1974)	Atlântico Ocidental

<i>(Tigrigobius zebrellus)</i>					
<i>Gobiopsis macrostoma</i>	46	10m+4sm+32a	60	Khuda-Bukhsh <i>et al.</i> (1995)	Indo-Pacífico
<i>Glossogobius fasciatuspunctatus</i>	44	10m+28sm+2st+4a	84	Fei & Tao (1987)	Indo-Pacífico
<i>(Glossogobius olivaceus)</i>					
<i>Glossogobius giuris</i>	46	46a	46	Rishi & Singh (1982)	Indo-Pacífico
<i>Gobiodon citrinus</i>	44	2m+42st/a	46	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
"	43	1m+42st/a	44	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
<i>Gobiodon quinquestrigatus</i>	44	44a	44	Arai & Fujiki (1979)	Indo-Pacífico
<i>Gobiodon rivulatus</i>	44	44a	44	Arai & Fujiki (1979)	Indo-Pacífico
<i>Gobius bucchichi</i>	44	2sm+42a	46	Thode & Alvarez (1983)	Atlântico Oriental
<i>Gobius cobitis</i>	46	46a	46	Caputo <i>et al.</i> (1997)	Atlântico Oriental
<i>Gobius couchi</i>	46	2sm+44a	48	Miller & El-Tawil (1974)	Atlântico Oriental
<i>Gobius cruentatus</i>	46	2st+44a	48	Thode & Alvarez (1983)	Atlântico Oriental
<i>Gobius fallax</i> ¹	38	8m/sm+30a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	39	7m/sm+32a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	40	6m/sm+34a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	40	7m/sm+33a	47	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	41	5m/sm+36a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	42	4m/sm+38a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
"	43	3m/sm+40a	46	Thode <i>et al.</i> (1988)	Atlântico Oriental
<i>Gobius niger</i> ¹	52	2m+4sm+16st+30a	74	Vitturi & Catalano (1989)	Atlântico Oriental
"	51	3m+4sm+16st+28a	74	Caputo <i>et al.</i> (1997)	Atlântico Oriental
"	50	4m+4sm+16st+26a	74	Caputo <i>et al.</i> (1997)	Atlântico Oriental
"	49	5m+4sm+16st+24a	74	Caputo <i>et al.</i> (1997)	Atlântico Oriental
<i>Gobius ophiocephalus</i> ¹	46	46a	46	Vasil'ev (1985)	Atlântico Oriental
<i>(Zosterisessor ophiocephalus)</i>					
<i>Gobius paganellus</i> ¹	48	2sm+46a	50	Caputo <i>et al.</i> (1997)	Atlântico Oriental
<i>Gobius similis</i>					Pacífico Ocidental
<i>(Rhinogobius similis)</i>	44	--	--	Nogusa (1960)	Atlântico Oriental
<i>Gobiusculus flavescens</i>	46	6m/sm+40a	52	Klinkhardt (1992)	Atlântico Oriental
<i>Mesogobius batrachocephalus</i>	30	16m+14a	46	Ivanov (1975)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius cephalargus</i>					Atlântico Oriental
<i>(Neogobius melanostomus)</i>	46	46a	46	Vasil'ev (1985)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius cyrius</i> ¹	38	8m/sm+30	46	Vasil'ev & Vasil'eva (1994)	Atlântico Oriental
<i>(Ponticola cyrius)</i>					
<i>Neogobius constructor</i> ¹	42	4m/sm+38a	46	Vasil'ev & Vasil'eva (1994)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius fluviatilis</i>	46	46a	46	Vasil'ev (1985)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius eurycephalus</i> ¹	32	12m+2sm+18a	46	Ene (2003)	Atlântico Oriental
<i>(Ponticola eurycephalus)</i>					
"	31	13m+2sm+16a	46	Ene (2003)	Atlântico Oriental
"	30	14m+2sm+14a	46	Ene (2003)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius gymnotrachelus</i> ¹	46	46a	46	Vasil'ev & Grogoryan (1992)	Atlântico Oriental
<i>(Babka gymnotrachelus)</i>					
<i>Neogobius kessleri</i>	46	46a	46	Vasil'ev (1985)	Atlântico Oriental
<i>(Ponticola gorlap)</i>					
<i>Neogobius melanostomus</i>	46	46a	46	Vasil'ev (1985)	Atlântico Oriental
<i>Neogobius rhodionii</i>					Atlântico Oriental
<i>(Ponticola rhodionii)</i>	46	46a	46	Vasil'ev & Vasil'eva (1994)	Atlântico Oriental
<i>Padogobius martensi</i>					
<i>(Padogobius bonelli)</i>	46	1m+3sm+2st+40a	52	Cataudella <i>et al.</i> (1973)	Atlântico Oriental
<i>Pomatoschistus lozanoi</i>	37	3m+12sm+10st+12a	62	Webb (1986)	Atlântico Oriental
<i>Pomatoschistus microps</i>	46	4m+16sm+20st+6a	86	Klinkhardt (1989)	Atlântico Oriental
<i>Pomatoschistus minutus</i>	46	4m+16sm+16st+10a	82	Klinkhardt (1989)	Atlântico Oriental
"	"	18sm+18st+10a	82	Klinkhardt (1992)	Atlântico Oriental
<i>Pomatoschistus norvegicus</i>	32	10m+10sm+8st+4a	60	Webb (1986)	Atlântico Oriental
<i>Pomatoschistus pictus</i>					
<i>(Pomatoschistus adriaticus)</i>	46	22m/sm+12st+12a	80	Klinkhardt (1992)	Atlântico Oriental
<i>Proterorhinus marmoratus</i>	46	46a	46	Rab (1985)	Atlântico Oriental
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	46	2m/sm+44a	48	Caputo <i>et al.</i> (1996)	Atlântico Oriental
<i>Valenciennea muralis</i>	46	46a	46	Khuda-Bukhsh & Nayak (1990)	Indo-Pacífico
<i>Valenciennea strigata</i>	44	2m+42st/a	46	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
Gobionellinae					
<i>Aboma lactipes</i>	40	40a	40	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
<i>(Acanthogobius lactipes)</i>					
<i>Acanthogobius elongatus</i>	42	8m/sm+34st/a	50	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Acanthogobius flavimanus</i>	44	44st/a	44	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
"	"	36st+8a	80	Arai & Kobayashi (1973)	
"	"	10m/sm/st+34a	54	Arai & Sawada (1975)	
<i>Acanthogobius hastata</i>	44	6m/sm+38st/a	50	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Acanthogobius lactipes</i>	40	40a	40	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Awaous flavus</i>	46			Oliveira <i>et al.</i> (2007)	Atlântico Ocidental
<i>Awaous grammepomus</i>	46	46st/a	46	Khuda-Bukhsh & Barat (1987)	Indo-Pacífico
<i>Awaous strigatus</i>	46	(♀) X1X1X2X2	--	Souza <i>et al.</i> (1998)	Atlântico Ocidental
"	45	(♂) X1X2Y	--	Souza <i>et al.</i> (1998)	
<i>Awaous tajasicus</i>	46	46a	46	Stange & Passamani (1986)	Atlântico Ocidental
<i>Brachygobius nunus</i>	48			Post (1965)	Indo-Pacífico
<i>Chaenogobius annularis</i>	44	18sm+26st/a	62	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
"	"	36sm/sm+8a	80	Arai <i>et al.</i> (1974)	
"	"	44a	44	Nogusa (1960)	
<i>Chaenogobius castaneus</i>					
<i>(Gymnogobius castaneus)</i>	44	36sm/sm/st+8a	80	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Chaenogobius isaza</i>	44	12sm+32st/a	56	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>(Gymnogobius isaza)</i>					
<i>Chaenogobius urotaenia</i>	44	--	--	Nogusa (1960)	Indo-Pacífico
<i>(Gymnogobius urotaenia)</i>					

"	42	14sm+28a	56	Yamada (1967)	
<i>Chasmichthys dolichognathus</i>	44	44st/a	44	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
(<i>Chaenogobius annularis</i>)					
<i>Chasmichthys gulosus</i>	44	44st/a	44	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
"	"	16m/sm/st+28a	60	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	
<i>Ctenogobius boleosoma</i>	44	2sm+42a	46	Lima-Filho <i>et al.</i> (2014)	Atlântico Ocidental
<i>Ctenogobius smaragdus</i>	48	2sm+46a	50	Lima-Filho <i>et al.</i> (2014)	Atlântico Ocidental
<i>Ctenogobius criniger</i>	50	34m/sm+6st+10a	90	Arai & Sawada (1974)	Indo-Pacífico
(<i>Yongeichthys criniger</i>)					
<i>Evorthodus lyricus</i>	46	24m+22sm	92	Presente estudo	Atlântico Ocidental
<i>Gilllichthys mirabilis</i>	44	12sm+32a	56	Chen & Ebeling (1971)	Indo-Pacífico
<i>Gilllichthys seta</i>	44	6sm+14st+24a	64	Chen & Ebeling (1971)	Atlântico Ocidental
<i>Gobionellus shufeldti</i>	48	48a (♀)	48	Pezold (1984)	Atlântico Ocidental
(<i>Ctenogobius shufeldti</i>)					
"	47	46m+1a (♂)	48	Pezold (1984)	
<i>Gobionellus oceanicus</i>	56	(♂) 12m+5st+39a	73	Lima-Filho <i>et al.</i> (2015)	Atlântico Ocidental
"	56	(♀) 12m+6st+38a	74	Lima-Filho <i>et al.</i> (2015)	
<i>Gobionellus stomatus</i>	56	(♂) 20m+15st+21a	91	Lima-Filho <i>et al.</i> (2015)	Atlântico Ocidental
"	56	(♀) 20m+16sm+20a	92	Lima-Filho <i>et al.</i> (2015)	
<i>Gobionellus microdon</i>	56	4m+6sm+46a	66	Uribe-Alcocer, Diaz-Jaimes (1996)	Pacifico Ocidental
<i>Gymnogobius breuniguu</i>	44	36m/sm/st+8a	80	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Gymnogobius heptacanthus</i>	44	44st/a	44	Lee (1986)	Indo-Pacífico
<i>Gymnogobius isaza</i>	44	12sm+32st	88	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>Gymnogobius castaneus</i>	42	14m/sm+28st	84	Arai <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Gymnogobius mororanus</i>	42	12m/sm+30st/a	54	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Gobius abei</i>	46	--	--	Nogusa (1960)	Indo-Pacífico
(<i>Mugilogobius abei</i>)					
<i>Luciogobius grandis</i>	44	--	--	Arai (1981)	Indo-Pacífico
<i>Luciogobius guttatus</i>	44	12st+32a	56	Murofushi (1980)	Indo-Pacífico
<i>Mugilogobius abei</i>	46	46st/a	46	Lee <i>et al.</i> (1987)	Indo-Pacífico
<i>Pterogobius elapoides</i>	44	14sm+30st	88	Arai & Kobayashi (1973)	Indo-Pacífico
<i>Pterogobius zonoleucus</i>	44	14sm+30st	88	Arai & Sawada (1975)	Indo-Pacífico
<i>Quietula guaymasiae</i>	42	6m+4sm+32a	52	Cook (1978)	Indo-Pacífico
<i>Quietula y-cauda</i>	42	42a	42	Cook (1978)	Indo-Pacífico
<i>Rhinogobius brunneus</i>	44	44a	44	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	Pacifico Ocidental
<i>Rhinogobius flumineus</i>	44	44a	44	Arai & Kobayashi (1973)	Indo-Pacífico
<i>Rhinogobius giurinus</i>	44	44a	44	Nishikawa <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Rhinogobius shemongensis</i>	44	44a	44	Dong (1984)	Indo-Pacífico
<i>Stigmatogobius sadanundio</i>	46	2sm+44a	48	Hinegardner & Rosen (1972)	Indo-Pacífico
<i>Tridentiger brevispinis</i>	44	10m/sm+34st	88	Arai & Kobayashi (1973)	Indo-Pacífico
<i>Tridentiger nudicervicus</i>	44		62	Lee (1986)	Indo-Pacífico
<i>Tridentiger obscurus</i>	44	10m/sm+34a	54	Arai <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>	44	28m/sm/st+16a	72	Arai <i>et al.</i> (1974)	Indo-Pacífico
"	46	16sm+6st+24a	68	Fei & Tao (1987)	
<i>Tukugobius flumineus</i>	44	44a	44	Nadamitsu (1974)	Indo-Pacífico
(<i>Rhinogobius flumineus</i>)					

() Representa nomenclatura atual para a espécie; ¹espécies presentes no Mar Mediterrâneo que apresentaram polimorfismos cromossômicos.

4. Discussão

Os padrões cariotípicos de *C. glaucofraenum* (2sm+38a) e *E. lyricus* (24m+22sm) corroboram a elevada diversidade cariotípica numérica e estrutural indicada para Gobiidae. Com 2n=46 cromossomos, *E. lyricus* exibe valor diploide considerado basal para a família, no entanto, a presença extensiva de cromossomos bibraquiais (NF=92) é indicativa de atuação intensa de inversões pericêntricas no estabelecimento deste padrão cariotípico. Por outro lado, *C. glaucofraenum* apresenta 2n=40, número inferior ao considerado basal, com os primeiros pares acrocêntricos exibindo tamanho significativamente maior que os demais, sugerindo como rearranjo promotor a ocorrência de fusão em *tandem*, mecanismo observado na diversificação cariotípica de outros gobídeos, como *G. paganelius* (Amores *et al.*, 1990).

Os sítios Ag-RONs constituem marcadores citotaxonômicos consistentes para muitos grupos de peixes (Caputo, 1998), sua localização e frequência revelam diferentes padrões de

disposição para os gobídeos (Ene, 2003; Galvão *et al.*, 2011), o que associado ao valor diploide e NF vem auxiliando na identificação de espécies crípticas (Lima-Filho *et al.*, 2012). Em *E. lyricus* e *C. glaucofraenum*, os sítios Ag-RONs se mostram simples, condição considerada simplesiomórfica não apenas aos teleósteos, como também para a maioria dos vertebrados (Ameniya & Gold, 1986). Em ambas as espécies, os sítios ribossomais são heterocromáticos e ricos em bases GC, condição encontrada nos pares organizadores de nucléolos de várias espécies da família (Mandrioli *et al.*, 2001; Ene, 2003; Lima-Filho *et al.*, 2012; 2014).

Regiões heterocromáticas heterogêneas ou com a presença de certos tipos de sequências repetitivas, entre elas sítios DNAr 5S, têm sido apontadas como facilitadoras de eventos de fusões cromossômicas em algumas espécies de Perciformes marinhos (Molina & Galetti, 2002; Araújo *et al.*, 2010; Jacobina *et al.*, 2011). Entre os Gobiidae existem indícios de heterogeneidade heterocromatínica em algumas espécies, como *Gobius paganellus*, *G. niger*, *G. cobitis* e *Zosterisessor ophiocephalus* (Caputo *et al.*, 1997), com possíveis implicações na ocorrência e fixação de modificações cromossômicas, dentre as quais fusões e fissões cêntricas (Canapa *et al.*, 2002). Análises mais pormenorizadas envolvendo o mapeamento de sequências repetitivas nos cromossomos de *C. glaucofraenum* poderão esclarecer melhor a possível participação destas sequências na redução cromossônica observada nesta espécie.

Apesar de limitado o número de estudos relacionados à identificação da distribuição de sequências específicas, a utilização de análises citogenéticas moleculares identificaram para espécies do gênero *Ctenogobius* um padrão de localização de sequências 5S extremamente derivado (Lima-Filho *et al.*, 2014). Análises citogenéticas e morfométricas em populações de *B. soporator*, distribuídas ao longo do litoral brasileiro, identificaram diferentes padrões de distribuições de sequências DNAr na população com maior plasticidade morfológica (Lima-Filho *et al.*, 2012). Estes dados indicam uma distribuição dinâmica de sequências específicas e oferecem suporte para a participação de modificações cromossômicas no processo de diversificação do grupo.

Os estudos cromossômicos em gobídeos têm sido mais frequentes em espécies do Pacífico e Mediterrâneo (e.g. Arai & Sawada, 1974; Vitturi & Catalano, 1989; Klinkhardt, 1992; Caputo *et al.*, 1997), embora a maioria dos dados referem-se a valores diploides e à macroestrutura do (Caputo *et al.*, 1998). Entretanto, apesar deste claro viés biogeográfico, algumas conclusões de caráter geral já podem ser obtidas a partir dos resultados já disponíveis.

Com base na distribuição geográfica das espécies de Gobiidae, constata-se uma tendência à variação de NF superior a 2n. Desta forma, a tendência apresentada pelas espécies do Pacífico e Atlântico Oriental indicam principalmente a ocorrência de inversões pericêntricas como agente promotor da modificação cariotípica. Por outro lado, indivíduos presentes no Atlântico Ocidental revelam tendência preferencial à variação de 2n, sugerindo uma ação conjunta de inversões pericêntricas e fusões Robertsonianas, sendo este último mecanismo o principal implicado nas modificações no número e estrutura cromossômica em Gobiidae (Thode *et al.*, 1988; Galetti *et al.*, 2000).

Os gobídeos do Atlântico Oriental exibiram menor tendência à variação 2n, o que indica certa estabilidade na macroestrutura cariotípica das espécies residentes. No entanto, é nesta região onde se apresenta o maior número de espécies com acentuado polimorfismo cromossômico (dados excluídos da análise PCA). Em alguns casos, tais eventos se mostram em condição transitória e se apresentam como variações cariotípicas intra e interpopulacionais como em *Aphia minuta*, na qual até cinco citótipos distintos foram identificados em única população (Caputo *et al.*, 1999). Espécies do gênero *Gobius*, como *G. niger* e *G. paganellus*, exibem tanto populações cariotipicamente monomórficas (Klinkhardt, 1992; Vasil'ev & Grigoryan, 1992), quanto outras com polimorfismo acentuado, envolvendo vários tipos de rearranjos cromossômicos (Vitturi & Catalano, 1989; Amores *et al.*, 1990; Caputo *et al.*, 1997). Esta elevada variação cromossônica para indivíduos desta região pode ser devido ao encontro de cariomorfos originados em diferentes zonas de abrangência geográfica das espécies ou uma tendência apresentada por representantes de gêneros mais amplamente estudados como o *Gobius*.

Dentre todas as representações cariotípicas, o cariótipo com 2n=46 cromossomos acrocêntricos tem sido considerado basal para a família Gobiidae, a partir do qual variações no número diploide e de cromossomos bi-braquiais representariam condições mais derivadas (Vasil'ev & Grigoryan, 1993). Com um total de 84% das espécies descritas citogeneticamente divergindo deste modelo, a elevada variação numérica e estrutural traz indícios de uma estreita relação entre os processos de diversificação e modificações cromossômicas na família.

Ao comparar o grau de diversificação do cariótipo e variação entre grupos de peixes presentes em ambiente marinho e de água doce, tem sido identificada uma maior derivação em espécies existentes em ambientes dulcícolas, relacionadas principalmente ao NF (Nirchio *et al.*, 2014). Estas modificações são justificadas pela elevada fragmentação de habitats em ambientes aquáticos continentais, obstáculo para o fluxo gênico inter populacional (Moreira-

Filho & Bertollo, 1991). A tendência à variação do NF, observada para gobídeos, sugere uma dinâmica carioevolutiva para o grupo semelhante ao apresentado por táxons dulcícolas. De fato, ao observarmos a evolução cariotípica em diferentes taxas de peixes marinhos, verificamos que Gobiidae apresenta o maior dinamismo evolutivo entre as famílias analisadas (Molina *et al.*, 2014). Apesar da aparente falta de barreiras físicas no ambiente marinho, fatores comportamentais e ecológicos (Rocha *et al.*, 2005) aliados a períodos pelágicos larvais variáveis podem representar efetivas barreiras ao fluxo gênico entre suas populações, ocasionando a fixação de modificações cromossômicas neste grupo de peixes.

A elevada taxa de cariótipos com $NF > 46$ presentes nas subfamílias Gobiinae (48%), Gobionellinae (68%) e Oxudercinae (86%) sugerem que as inversões pericêntricas tenham desempenhado papel importante no estabelecimento cariotípico de seus representantes. Gobiinae e Gobionellinae são as subfamílias de maior representatividade em número de espécies na família Gobiidae, respectivamente 1.132 e 418 espécies válidas (Eschmeyer, 2014). A tendência que ambas apresentam para uma maior variação do NF do que do valor diploide sugere que mudanças cariotípicas estruturais seriam provavelmente mais toleráveis do que mudanças numéricas neste grupo de peixes.

Os gobídeos destacam-se dentre os vertebrados quanto a sua capacidade a se adaptar e diversificar em novas formas (Patzer *et al.*, 2012). Devido à grande diversidade de espécies e imprecisões taxonômicas, a utilização de ferramentas citogenéticas vem auxiliando a identificação da diversidade desta família (Lima-Filho *et al.*, 2015) e os processos evolutivos associados a ela. De fato, os resultados obtidos vem destacando a estreita correlação entre a diversificação filética e as modificações apresentadas na estrutura do cariotípico deste grupo.

5. Referências

- Amemiya, C.T., Gold, J. R. 1986. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1986: 226–231.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G. 1990. Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* 65: 151–155.
- Arai, R., Sawada, Y. 1974. Chromosomes of Japanese gobioid fishes. *Bulletin National Science Museum Tokyo* 17: 97–105.
- Arai, R. 1981. Fishes of the genus *Luciogobius* and *Inu* (Gobiidae) from peninsula Idzu, Central Japanese Memoirs National Science Museum 14: 151-166.
- Arai, R. 2011. Fish karyotypes A Check List. Springer, Japan.

- Arai, R., Kobayasi, H. 1973. A chromosome study on thirteen species of Japanese gobiid fishes. *Japan Journal Ichthyology* 20: 1–6.
- Arai, R., Fujiki, S. 1979. Chromosomes of Japanese gobioid fishes (IV). *Bulletin National Science Museum* 5: 153-159.
- Arai, R., Katsuyama, I., Sawada, Y. 1974. Chromosomes of Japanese gobioid fishes (II). *Bulletin National Science Museum Tokyo* 17: 269-279.
- Arai, R., Sawada, Y. 1975. Chromosomes of Japanese gobioid fishes (III). *Bulletin National Science Museum Tokyo* 1: 225–232.
- Araujo, W. C., Martinez, P. A., Molina, W. F. 2010. Mapping of ribosomal DNA by FISH, EcoRI digestion and replication bands in the Cardinalfish *Apogon americanus* (Perciformes). *Cytologia* 75: 1109-117.
- Brum, M. J. I. 1995. Correlações entre a filogenia e a citogenética de peixes teleósteos. *Revista Brasileira de Genética – Série Monografias* 2: 5-42.
- Brum, M. J. I. 1996. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Genetetics* 19: 421-427.
- Brum, M. J. I., Galetti-Jr., P. M. 1997. Teleostei plan ground karyotype. *Journal of Computational Biology* 2: 91-102.
- Canapa, A., Cerioni, P. N., Barucca, M., Olmo, E., Caputo, V. 2002. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research* 10: 297-304.
- Caputo V. 1998. Nucleolar organizer (NOR) location and cytotaxonomic implications in six species of gobiid fishes (Perciformes, Gobiidae). *Ital J Zool* 65: 93–99.
- Caputo, V., Caniglia, M. L., Machella, N. 1999. The chromosomal complement of *Aphia minuta*, a paedomorphic goby. *Journal Fish Biology* 55: 455–458.
- Caputo, V., Marchegiani, F., Sorice, M., Olmo, E. 1997. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 79: 266-271.
- Caputo, V., Sorice, M., Vitturi, R., Magistrelli, H., Olmo, E. 1998. Cytogenetic studies in some species of Scorpaeniformes (Teleostei: Percomorpha). *Chromosome Research* 6: 255–262.
- Caputo, V., Vitturi, R., Odierna, G., Cano, J., Olmo, E., Colombara, M.S. 1996. Characterization of mitotic chromosomes in the Gobiid fish *Zosterisso ophiocephalus* (Pallas, 1811) (Perciformes, Gobiidae). *Biologisches Zentralblatt* 115: 328-336.

- Carvalho, R., Soares-Filho, W. S., Brasileiro-Vidal, A. C., Guerra, M. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: A chromosomal comparison. *Cytogenetic Genome Research* 109: 276-282.
- Cataudella, S., Civitelli, M. V., Capanna, E. 1973. The chromosomes of some mediterranean teleosts: Scorpidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Gobiidae (Pisces: Scorpidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Gobiidae). *Bulletino di Zoologia* 40: 385-389.
- Chen, T. R. Ebeling, A. W. 1971. Chromosomes of the goby fishes in the genus *Gillichthys*. *Copeia* 1971: 171-174.
- Cipriano, R. R., Cestari, M. M., Fenocchio, A. S. 2002. Levantamento citogenético de peixes marinhos do litoral do Paraná. In: Simpósio de citogenética e genética de peixes, IX. Paraná. Universidade Estadual de Maringá, p.111.
- Cook, P. C. 1978. Karyotypic analysis of the gobiid fish genus *Quietula* Jordan and Evermann. *Journal Fish Biology* 12: 173-179.
- Dong, Y. K. 1984. Karyotypes of four freshwater fishes (Perciformes). *Freshwater Fish* 4 23–24.
- Ene, A. C. 2003. Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Marine Biology* 142: 583-588.
- Eschmeyer, W. N. 2013. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences (accessed 29.01.15).
- Fei, Z., Tao, R. 1987. Studies on the karyotypes of four species in Gobioidei and compared with other fishes in there. *Journal Zhejiang College of Fisheries* 6: 127-131.
- Froese, R., Pauly, D. 1999. FishBase 99: concepts, design and data sources. ICLARM, Manila, Philippines, 329p.
- Galetti-Jr, P. M., Aguilar, C. T., Molina, W. F. 2000. An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420: 55-62.
- Galvão, T. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2011. Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioidei species (Perciformes). *Comparative Cytogenetics* 5: 259–275.
- 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.
- Grigoryan, K. A., Vasil'ev, V. P. 1993. Karyotypes of five species of goby (Gobiidae) from the basins of the Black and Caspian Seas. *Journal Ichthyology* 33: 137–143.
- Hinegardner, R., Rosen, D. E. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *The American Naturalist* 106: 621–644.

- Howell, W. M. Black, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Ivanov, V. N. 1975. Chromosomes of the Black sea Gobiidae - *Gobius melanostomus* (Pallas) and *Gobius batrachocephalus* (Pallas). *Tsitologiya i Genetika. Cytology and Genetics* 9: 551-552.
- Jacobina, U. P., Cioffi, M. B., Souza, L. G. R., Calado, L. C., Tavares, M., Mazella-Jr, J., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 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: 218-231.
- Khuda-Bukhsh, A. R. 1978. Somatic chromosomes of an estuarine fish, *Trypauchen vagina* (Fam: Gobiidae) from Sagar Island, West Bengal, India. *Current Science* 47: 137-138.
- Khuda-Bukhsh, A. R., Barat, A. 1987. Chromosomes in fifteen species of Indian teleost (Pisces). *Caryologia* 40: 131-144.
- Khuda-Bukhsh, A. R., Nayak, K. 1990. Karyotypic studies in six species of brackish water fishes from India. *La Kromosomo* 58: 1955–1960.
- Khuda-Bukhsh, A. R., Rahman, A., Chanda, T., Nayak, K., Khuda-Bukhsh, A. 1995. Diploid numbers and chromosome formulae of some 29 species of Indian teleosts (Pisces). *Chromosome Information Service* 58: 38–39.
- Khuda-Bukhsh, A. R. Barat, A. 1984. Somatic and germinal chromosomes of a gobiid, *Boleophthalmus dentatus* (Pisces). *Life Science Advances* 3: 146–148.
- Klinkhardt, M. 1989. Untersuchungen zur Karyologie und Fruchtbarkeit von *Pomatoschistus microps* (Kroyer) und *P. minutus* (Pallas) (Teleostei, Gobiidae). Aus einem inneren Küstengewässer der südwestlichen Ostsee. *Zoologischer Anzeiger* 222: 177-190.
- Klinkhardt, M. B. 1992. Chromosome structures of four Norwegian gobies (Gobiidae, Teleostei) and a hypothetical model of their karyo-evolution. *Chromatin* 1: 169–183.
- Lacson, J. M. 1992. Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and Discovery Bay, Jamaica. *Marine Biology* 112: 327-331.
- Lee, G. Y. 1986. Karyotypes of the family Gobiidae fishes from Korea. *Zoological Science* 3: 1115p.
- Lee, G. Y. 1986. Karyotypes of the family Gobiidae fishes in Korea. *Korean Journal of Limnology* 19: 49–57.
- Lee, G. Y., Jang, S. I., Yun, M. J., So, J. N. 1987. Karyotypes of sixteen species of gobiid fishes from Korea. *Basic Science Review, Jeonbuk National University* 10: 1-14.
- Levan, A., Fredga, K., Sandeberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

- Lima-Filho, P. A., Cioffi, M. B., Bertollo, L. A. C., Molina, W. F. 2012. Karyoevolution and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). Journal Experimental Marine Biology Ecology 43: 63-70.
- Lima-Filho, P. A., Rosa, R. S., Souza, A. S., Costa, G. W. W. F., Oliveira, C., Molina, W. F. 2015. Evolutionary diversification of the Western Atlantic species of *Bathygobius* (Gobiidae) based on cytogenetic, morphologic and DNA barcode data. Reviews in Fish Biology and Fisheries, In press.
- 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 Genome Research 142: 197-203.
- Mandrioli, M., Manicardi, G. C., Machella, N., Caputo, V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). Genetica 110: 73-78.
- Manna, G. K., Prasad, R. 1974. Chromosome analysis in three species of fishes belonging to family Gobiidae. Cytologia 39: 609-618.
- Matsuo, T. 1998. Karyotypes of the Oxudercinae (Teleostei, Gobiidae). Unpublished Master Thesis, Faculty of Fisheries, Nagasaki University.
- Menezes, N. A., Buckup, P. A., Figueiredo, J. L., Moura, R. L. 2003. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 160p.
- Miller, P. J. El-Tawil, M. Y. 1974. A multidisciplinary approach to a new species of *Gobius* (Teleostei: Gobiidae) from southern Cornwall. Journal of Zoology, London 174: 539–574.
- Molina, W. F. 2001. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. Chromosome Science 5:49–152.
- Molina, W. F. 2007. Chromosome changes and stasis in marine fish groups, in Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): Fish Cytogenetics 1-52.
- Molina, W. F., Alves, D. E. O., Araújo, W. C. Martinez, P. A. Silva, M. F. M. Costa, G. W. W. F. 2010. Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. Genetics and Molecular Research 9: 1807-1814.
- Molina, W. F., Bacurau, T. O. F. 2006. Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). Cytologia 71: 237-242.
- Molina, W. F., Galetti-Jr, P. M. 2002. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. Genetics and Molecular Biology 24: 373-377.

- Molina, W. F., Martinez, P. A., Bertollo, L. A. C., Bidau, C. J. 2014. Preferential accumulation of sex and Bs chromosomes in biarmed karyotypes by meiotic drive and rates of chromosomal changes in fishes. Anais da Academia Brasileira de Ciências 86: 1801-1812.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C. 1991. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. Revista Brasileira de Genética 14: 331-357.
- Murofushi, M., Oishi, M. Nawa, N. 1980. Karyological studies in *Luciogobius guttatus*. Report of the Mishima Research Institute of Sciences for Living, Nihon University 3: 51-52.
- Musammil, A. 1974. A chromosome study of two species of *Gobiosoma* from Venezuela (Gobiidae, Teleostei). Bulletin Institute Oceanography University Oriente 13: 11-16.
- Nadamitsu, S. 1974. Karyological studies of two types of Gobioid fish, "Yoshinobori". Bulletin of Hiroshima Women's University 9: 3-9.
- Nayak, K., Khuda-Bukhsh, A. R. 1987. Chromosomes of two species of fishes *Apocryptes* (Gobiidae: Pisces). Environmental Ecology 5: 371-373.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Nirchio, M., Rossi, A. R., Foresti, F., Oliveira, C. 2014. Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species. Neotropical Ichthyology 12: 762-770.
- Nishikawa, S., Amaoka, K., Nakanishi, K. 1974. A comparative study of chromosomes of twelve species of gobioid fish in Japan. Japan Journal Ichthyology 21: 61-71.
- Nogusa, S. 1960. A comparative study of the chromosomes of fishes with particular considerations on taxonomy and evolution. Memoirs Hyogo University Agricultural 3: 1-62.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. F., Foresti, F. 2007. Karyotypic evolution in neotropical fishes. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B. G. (eds) Fish cytogenetics. Science Publishers, Enfield, pp. 111-164.
- Patzner, R. A., Tassell, J. L. V., Kovacic, M., Kapoor, B. G. 2012. The biology of Gobies, CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 13: 978-1-4398-6233-9.
- Pezold, F. 1984. Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldti* (Pisces: Gobiidae). Copeia, 1984: 235-238.
- Post, A. 1965. Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süsswasser-Teleosteern. Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung 3: 47-93.
- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- Rab, P. 1985. Karyotype of the Danude goby, *Proterorhinus marmoratus* (Pisces, Gobiidae). *Folia Zoologica* 34: 329-334.
- Rishi, K. K., Singh, J. 1982. Karyological studies on five estuarine fishes. *Nucleus* 25: 178-180.
- Rocha, L.A., Robertson, D.R., Rocha, C.R., Van Tassell, J.L., Craig, M.T., Bowen, B.W. 2005. Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology* 14: 3921-3928.
- Souza, I.L., Moreira-Filho, O. Bertollo, L.A.C. 1998. Contribuição citogenética em Gobiidae. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada de Peixes Neotropicais, p. 26. Londrina, Paraná, Brazil.
- Stange, E. A. R., Passamani, M. 1986. Caracterização cromossômica de *Awaous tajasica* (Lichtenstein, 1822) (Pisces, Gobiidae). In: I Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais. São Carlos, São Paulo, 59p.
- Subrahmanyam, K. 1969. A karyotypic study of the estuarine fish *Boleophthalmus boddaerti* (Pallas) with calcium treatment. *Current Science* 38: 437-439.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Thode, G., Alvarez, M. C. 1983. The chromosome complements of two species of *Gobius* (Teleostei, Perciformes). *Experientia* 39: 1312-1314.
- Thode, G., Martinez, G., Ruiz, J. L. Lopez, J. R. 1988. Complex chromosomal polymorphism in *Gobius fallax* (Gobiidae, Perciformes). *Genetica* 76: 65-71.
- Uribe-Alcocer, M., Diaz-Jaimes, P. 1996. Chromosome complements of *Gobionellus microdon* and *Eleotris picta* collected in Mexico. *Journal of Fish Biology* 48: 796-798.
- Vasil'ev, V. P. Grigoryan, K. A. 1990. Broad chromosome polymorphism in the Caucasus river goby. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 311: 1509-1511.
- Vasil'ev, V. P., Grigoryan, K. A. 1993. Karyology of the Gobiidae. *Journal of Ichthyology* 33: 1-16.
- Vasil'ev, V. P. 1985. The evolutionary karyology of fishes. *Evoluzionnaja kariologiya ryb* Nauka Moscow, 300p.
- Vasil'ev, V. P., Grigoryan, K. A. 1992. Karyology of fishes from the family Gobiidae. *Voprosy Ikhtiologii* 32: 27-40.
- Vasil'ev, V. P., Vasil'yeva, E. D. 1994. The new systematics of freshwater Caucasian gobies: three distinct species within former *N. Platyrostris constructor* (Gobiidae). In: Abstract. VIII European Society Congress of Ichthyology Oviedo, 66p.

- Verma, G. K. 1968. Studies on the structure and behaviour of chromosomes of certain fresh water and marine gobiid fishes. Annals of the National Academy of Sciences India 1968: 178.
- Vitturi, R., Catalano, E. 1989. Multiple chromosome polymorphism in the gobiid fish *Gobius niger jozo* (Linneus 1758) (Pisces, Gobiidae). Cytologia 54: 231–235.
- Webb, C. J. 1986. Karyology of the Indo-Pacific *Parioglossus raoi* (Herre) (Teleostei: Gobioidei) from Fiji. Australian Journal Marine and Freshwater Research 37: 347-351.
- Yamada, J. 1967. An observation of the chromosomes in the embryonic cells of a goby, *Chaenogobius urotaenia* (Hilgendorf). Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University 18: 183-187.

Considerações finais

- Dados cromossômicos, combinados com análises morfológicas em populações distribuídas ao longo do litoral brasileiro, demonstraram para o gobídeo *B. soporator* um cenário evolutivo de fragmentação populacional e adaptação a novos habitats;
- A utilização de caracteres cromossômicos, moleculares e da forma corporal se mostrou muito resolutiva em estudos evolutivos do gênero *Bathygobius*. O conjunto destas abordagens propiciou a redefinição geográfica de uma espécie, *Bathygobius* sp.1 (*B. geminatus*), até então citada nominalmente de forma imprecisa para o litoral do Brasil como *B. mystacium*, e a identificação de uma nova espécie (*Bathygobius* sp.2) presente no Atol das Rocas e Arquipélago de Fernando de Noronha;
- A análise comparativa do dimorfismo sexual presente em diferentes populações de *B. soporator* ao longo do litoral brasileiro destacou elevada plasticidade morfológica desta espécie, ausência de relação com a hipótese de Rensch e variação do SShD latitudinal, que se mostrou minimiza nas populações mais ao Sul da costa brasileira. Esta condição, associada ao estabelecimento de caracteres sexuais favoráveis, pode desempenhar um papel importante no processo de diversificação e acrescenta novas perspectivas à busca da melhor compreensão dos fatores ecológicos e evolutivos que atuam nos processos vicariantes implicados na diversificação da família Gobiidae e de outros peixes marinhos;
- A evolução cromossômica das espécies de *Ctenogobius* se deu por diferentes mecanismos de rearranjos cromossômicos (inversões pericêntricas, fusões em tandem) e da dispersão aparentemente rápida e extensa de sequências de DNA 5S no cariótipo;
- Ao contrário do que ocorre em algumas famílias de peixes, em que os cromossomos性uais apresentam origens independentes, características compartilhadas entre os cromossomos X e Y de *G. oceanicus* e *G. stomatus* sugerem uma provável origem evolutiva única deste sistema de cromossomos sexuais. Além disso, a distribuição variável de DNA repetitivo nos cromossomos indica processos marcantes de diversificação genômica como parte da história evolutiva dessas espécies;

- As tendências às variações numéricas e estruturais demonstradas pelas subfamílias de Gobiidae sugerem uma dinâmica carioevolutiva para o grupo semelhante à apresentada por táxons dulcícolas, sendo as inversões pericêntricas e fusões Robertsonianas os principais mecanismos promotores de modificações cromossômicas;
- Devido à grande diversidade de espécies e imprecisões taxonômicas, a utilização de dados citogenéticos tem se mostrado eficaz na identificação da biodiversidade e dos processos evolutivos da família Gobiidae. As espécies do Atlântico reforçam a elevada diversidade cariotípica apresentada por este grupo e a estreita relação entre os processos de diversificação filética e modificações cromossômicas.