UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Vanessa Paes da Cruz

Estudos citogenéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na bacia superior do rio Paraná.

Botucatu – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

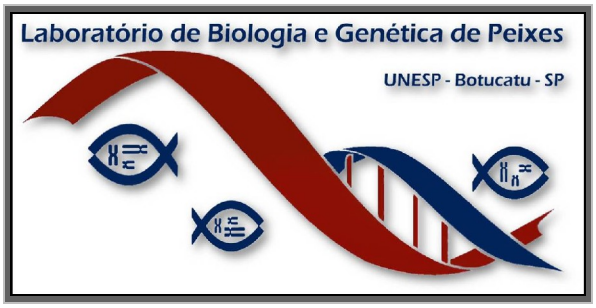
Cruz, Vanessa Paes da.
Estudos citogenéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na bacia superior do rio Paraná / Vanessa Paes da Cruz. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.
Orientador: Fausto Foresti
Assunto CAPES: 20204000

1. Raia (Peixe) - Paraná, Rio, Bacia 2. Peixe - Genética 3. Zoologia

CDD 597.55

Palavras-chave: Genes ribossômicos; *Potamotrygon*; Raias; Técnicas citogenéticas


Laboratório de Biologia e Genética de Peixes
UNESP - Botucatu - SP

Aos meus pais, que sempre se dedicaram, me incentivaram e estiveram presentes em todas as etapas da minha vida...

Qual o sentido da vida
Viver por mera falta do que fazer
Viver por insistir em ter algo pra fazer
Viver apenas por confundir
Vida com sobrevivência

O sentido da vida
É mais complexo do que se pode imaginar
Nossa imaginação é limitada apenas ao que vemos
E se nunca vemos nada além da vida
É porque não vivemos nada mais do que permitiram

Viver é mais do que respirar
É sentir o amor brotar com o nascer do sol
É deixar escorrer pelo rosto o orvalho do amanhecer
É querer mais do que apenas querer
Queimar o sol que existe dentro de nós

A vida não se mede em tempo
O tempo é curto para que uma vida seja vivida
A qualquer momento o relógio para
E o tempo que tínhamos chega ao final
E o final acaba chegando antes do que deveria

Vivo os momentos da vida
Os bons e os maus, os duros e os fáceis
A cada sentimento que eu deixo para trás
Eu arranco um pedaço de minha alma
Por pura ignorância de querer ser feliz

A vida não é só alegria
É dor, lágrimas, amor e compaixão
Viva cada momento como se fosse acordar
Bom ou ruim logo irá passar
E irá perceber que nada passou de um sonho

Autor: Alan Pooh

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!!!

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por orientar-me, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo exemplo, pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho. “O saber se aprende com os mestres. A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”. *Cora Coralina.*

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos.

A Dra. Cristiane Shimabukuro Dias, pelas risadas, amizade, e é claro pelas longas discussões, que ajudaram imensamente no desenvolvimento desse trabalho. Muito Obrigada! “A dúvida é o princípio da sabedoria”. *Aristóteles.*

Ao grande colega de trabalho Renato Devidé, sempre presente e disposto a ajudar nas coletas e nas preparações cromossômicas.

Ao Mrs. Marlon F. Pazian, pela amizade, discussões de teimosias e vários conselhos profissionais. Ao Mrs. Gustavo L.R. Pescatori, pelo apoio desde a primeira prática de citogenética de raias realizada.

Aos companheiros de risadas e distrações, Mestrandos Fábio Roxo, Guilherme, Jefferson, e Doutorandos Kelly, Marlon, Emanuel Luiz. “A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens”. *François La Rochefoucauld.*

À Doutoranda Lessandra De Rosa pela “sempre” disponibilidade em ajudar e à Mestranda Natália pela amizade e muitas risadas.

Ao Doutorando Ricado Paiva pelas várias sugestões e discussões sobre melhorias na citogenética.

Agradeço o apoio, carinho e amizade dos inúmeros companheiros do Departamento de Morfologia: Tatiane, Juliana, Gueodai, Prof. Celso, Conrado, Zeca, Patrícia, Luiz (japonês), Marhmoud, Ricardo (Iniciação), Gleysi, Daniela, Claudinha, Juliana Mazzuks, Alfe, Márcio, Danillo, Diogo e Kbelo.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu-SP) e ao Departamento de Morfologia que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

Aos professores Drs. Artur Antônio Andreata e Rodrigo Brás de Castilho Almeida, pelos exemplos na área de pesquisa e ensinamentos ao longo da faculdade.

Aos funcionários, técnicos Zé e Ricardo Texeira (pelas risadas), Dona Yolanda, Vanda e Dona Tera (que sem seu café seria extremamente difícil ficar acordada após os almoços).

Às amigas de faculdade: Érica, Verônica e Syrilla pela amizade há mais de 4 anos. Às amigas Renata, Carol, Manu (irmã de coração) e Glaura, pelas horas de descanso, descontração e companheirismo. À Vanessinha, que apesar da distância, a amizade não desapareceu; ao contrário, só tende a se fortalecer. “Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias. Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias”. *Lao-Tsé.*

Ao meu namorado Jefferson, pelo companherismo, por “toda” a paciência (principalmente nesses últimos meses) e todo o carinho dedicado!

A toda minha família, meus pais: José A. Paes e D. Yolanda, e irmãos: Anderson e Andresa, pelo apoio finaceiro, amizade, churrascos e, é claro, a confiança. *Muito obrigada!*

RESUMO

As raias da família Potamotrygonidae são importantes componentes da ictiofauna Neotropical, sendo este grupo de organismos completamente restrito aos sistemas fluviais da América do Sul. Três gêneros são relacionados nessa familia: *Plesiotrygon, Paratrygon e Potamotrygon* e são encontrados nos principais sistemas fluviais na região Neotropical. No presente projeto, foi realizada a análise citogenética em representantes de duas espécies de raias, *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*, que apresentaram números diplóide de 2n=65 nos machos e NF= 66 nas fêmeas, caracterizando a ocorrência de heteromorfismo cromossômico sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Em *P. motoro* a população de Porto Rico apresentou número fundamental de 116 (22m+8sm+20st+6a) nas fêmeas, e 114 (21m+9sm+19ST+16a) nos machos. A população de Ilha solteira apresentou número fundamental 122 (20m+10sm+26st+10a) nas fêmeas e 114 (22m+20sm20+st+10a) nos machos. Em *P. falkneri*, a população de Porto Rico apresenta número fundamental 110 (20m+10sm+14st+22a) nas fêmeas e 108 (19m+20sm+11st+22a) nos machos. A população de Ilha Solteira apresenta número fundamental de 114 (20m+10sm+18st+18a). A heterocromatina constitutiva (Banda C) foi identificada na forma de blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos do complemento. As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) caracterizadas nesta impregnação com nitrato de Prata, se apresentaram em marcaçõesm múltiplas e em posiçõa terminal nos cromossomos das duas espécies. O emprego do fluorocromo CMA3 evidenciou, além das Ag-RONs, marcações adicionais nas duas espécies em estudo, caracterizando outras regiões no genoma também ricas em GC. Foram identificados também cístrons ribossômicos através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 18S, que coincidiu com as mesmas marcações evidenciadas pela impregnação da Prata nas duas espécies.

Um sítio adicional foi encontrado para a espécie *P. falkneri,* população de Ilha Solteira. A sonda de DNAr 5S revelou quatro sítios em regiões terminais nas duas populações de *P. motoro*, em alguns casos coincidentes com os sítios de DNAr 18S, revelando regiões sintênicas. Em *P. falkneri*, foram encontrados sítios de DNAr 5S nas regiões terminais de três cromossomos, dois deles coincidentes com os sítios de DNAr 18S, portanto sintênicos. Duas classes de DNAr 5S foram identificadas em P. motoro, uma consistindo de repetições de 350 pb (tipo I) e outra com repetições de 1900 pb (tipo II). A localização cromosômica dos genes DNAr 5S, mostrou que estes estão localizados em dois loci cromossomicos, um menor, presente em um par cromossômico metacentrico, e outro maior, presente em um par de cromossomos submetacentricos. Estes resultados caracterizam duas subfamílias gênicas de DNAr 5S que têm evoluído independentemente e podem estar sendo governadas por forças evolutivas distintas e expressando dois tipos de DNAr 5S nos peixes. Os dados obtidos, além de revelarem apectos citogenéticos e moleculares destas espécies, podem fornecer subsídios para futuros estudos que visem a compreensão das relações entre as espécies deste grupo.

ABSTRACT

Stingrays of the family Potamotrygonidae are important components of the Neotropical ichthyofauna, being the only group of elasmobranchs completely restricted to fluvial systems of South America. Three genera are recognized within the family: *Paratrygon*, *Plesiotrygon*, and *Potamotrygon.* In the present project cytogenetic analysis were accomplished in representative species of two populations of *P. motoro* and *P. falkneri*, presented a male karyotype 2n=65 and female 2n=66, constituting a case of sexual chromosomal heteromorphism of the type $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. In *P. motoro* the population of Porto Rico presented fundamental number 116 (11m +4 SM +10 ST +8 A). The population of Ilha Solteira presented fundamental number 122 (10M +5 SM +13 ST +5 A). In *P. falkineri*, the population of Porto Rico presents fundamental number 110 (10M +5 SM +7 ST +11 A). The population of Ilha Solteira presents fundamental number of 114 (+9 ST 10M +5 SM +9 A). Constitutive heterochromatin (C Band) revealed heterochromatic blocks in the centromeric regions of almost all the chromosomes of the complement. The nucleolar organizer regions (NORs) by impregnation with silver nitrate, showed multiple and terminals NORs in the two species. The use of fluorochrome CMA3 showed, in addition to the Ag-NORs, additional marks in the two studied species. Cístrons ribossômicos were identified by fluorescent in situ hybridization (FISH) with the probe of 18S rDNA, which coincided with the same markings evidenced by the impregnation of silver in the two species, and one additional site was found for the species *P. falkineri*, population of Ilha Solteira. The probe of 5S rDNA revealed four sites in terminal regions in two populations of *P. motoro,* coinciding with the sites of 18S rDNA, revealing regions of co-localization. In *P. falkneri*, sites of 5S rDNA were found in terminal regions of three chromosomes, two of them coincide with the sites of 18S rDNA, therefore is also co-localization. Two classes of 5S rDNA were identified for *P. motoro*, one consisting of repeat units around (350) (Class I) and another one with (1900) bp (Class II). The 5S rRNA genes were clustered in two chromosome loci, a minor

one localized at metacentric chromosome pair, and a major one at submetacentric chromosome pair. The present work characterized two 5S rDNA subgene families that have been evolving separately and have been governed by distinct evolutionary forces and might be expressing two different types of 5S rDNAs. The obtained data, besides revealing cytogenetic aspects and molecular of these specie, can give base to future studies that look for the understanding the relationship between species of this group.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Exemplar da espécie *Potamotrygon motoro* (fêmea) de ocorrência na bacia superior do rio Paraná 04

Figura 2 – Exemplar da espécie *Potamotrygon falkneri* (macho) de ocorrência na bacia superior do rio Paraná 04

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3 – Mapa hidrográfico da América do Sul, mostrando em destaque a bacia do rio Paraná 20

Figura 4 – Mapa da bacia hidrográfica do rio Paraná, evidenciando os locais de coleta das espécies *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* 20

Figura 5 – Foto do local de coleta no rio Paraná, no município de Porto Rico.....21

Figura 6 – Foto do local de coleta no rio Paraná, no município de Ilha Solteira.....21

CAPÍTULO 1

Figura 01 – Cromossomos meióticos de *Potamotrygon falkneri* , população de Ilha Solteira, (a) metáfase espermatogonial (2n=65 cromossomos) após coloração com Giemsa e metáfase I (b), com 30 bivalentes (aproximadamente) e um trivalente (indicado pela seta). 57

Figura 02 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C. 58

Figura 03 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.. 59

Figura 04 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.. 60

Figura 05 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por

Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C 61

Figura 06 – Cariótipo de *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giensa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C... 62

Figura 07 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (macho) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giensa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.... 63

Figura 08 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C... 64

Figura 09 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (Macho) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.... 65

Figura 10 – Metáfases somáticas, após tratamento com coloração por nitrato de Prata, as setas e os asteriscos indicam os sítios Ag-RONs ativos. (a) *P. motoro* - população de Porto Rico e Ilha solteira (b), *P. falkneri* população de Porto Rico (c) e Ilha Solteira (d)..... 66

CAPÍTULO 2

Figura 01 – Cariótipo de *Potamotrygon motoro*, fêmea (a) e macho (b) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, após coloração convencional por Giemsa..... 82

Figura 02 – Cariótipo de *Potamotrygon motoro*, fêmea (a) e macho (b) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, após coloração convencional por Giemsa.... 83

Figura 03 – Cariótipo de *Potamotrygon falkneri,* fêmea (a) e macho (b) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, após coloração convencional por Giemsa..... 84

Figura 04 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri,* fêmea (a) e macho (b) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, após coloração convencional por Giemsa..... 85

Figura 05 – Metáfases somáticas de *Potamotrygon motoro* (fêmea), da população de Porto Rico, (a) após coloração convencional com Giemsa, análise seqüencial da

heterocromatina constitutiva (b), *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Ilha Solteira após coloração convencional com Giemsa (c), e identificação da heterocromatina constitutiva (d)..... 86

Figura 06 – Metáfases somáticas de *Potamotrygon falkneri* (fêmea), da população de Porto Rico, (a) após coloração convencional com Giemsa, análise seqüencial da heterocromatina constitutiva (b), *Potamotrygon falkneri* (macho) da população de Ilha Solteira após coloração convencional com Giemsa (c), e identificação da heterocromatina constitutiva (d)..... 87

Figura 07 – Cariótipos parciais de: a) *Potamotrygon motoro* (Porto Rico), após emprego da técnica de Ag-RON; b) *P. motoro* (Porto Rico), após coloração com o fluorocromo CMA_3; c) *P. motoro* (Ilha Solteira), após emprego da técnica de Ag-RON; d) *P. motoro* (Ilha Solteira), após coloração com o fluorocromo CMA_3; e) *Potamotrygon falkneri* (Porto Rico), após emprego da técnica de Ag-RON; f) *P. falkneri* (Porto Rico), após coloração com o fluorocromo CMA_3; g) *P. falkneri* (Ilha Solteira), após emprego da técnica de Ag-RON; h) *P. falkneri* (Ilha Solteira), após coloração com o fluorocromo CMA_3.....88

Figura 08 – Metáfases somáticas, após coloração com o Fluorocromo CMA_3, de *Potamotrygon motoro* (a) população de Porto Rico, (b) população de Ilha Solteira, e *Potamotrygon falkneri* (c) população de Porto Rico, (d) população de Ilha Solteira. as setas e os asteriscos representam os sítios GC-positivos..... 89

Figura 09 – Metáfase somática de *Potamotrygon motoro* (fêmea), após hibridação *in situ* fluorescente, da população de Porto Rico, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (a), 18S (b), e localização simultânea das sondas (c). *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (d), 18S (e) e localização simultânea das sondas (f). As setas e asteriscos indicam a localização dos sítios ribossomais..... .90

Figura 10 – Metáfase somática de *Potamotrygon falkneri* (fêmea), após hibridação *in situ* fluorescente, da população de Porto Rico, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (a), 18S (b), e localização simultânea das sondas (c). *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (d), 18S (e) e localização simultânea das sondas (f). As setas e asteriscos indicam a localização dos sítios ribossomais..... 91

CAPÍTULO 3

Figura 01 – Amplificação de repetições de DNAr 5S de *Potamotrygon motoro,* população de Porto Rico, visualizadas em gel de agarose 2%. (M) corresponde a uma amostra de DNA de um exemplar macho, (F) corresponde a uma amostra de DNA de um exemplar fêmea, (L) marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen Life Technologies).....105

Figura 02 – Metáfases de *Potamotrygon motoro* da população de Porto Rico, (a) após hibridação *in situ* com a sonda DNAr 5S de 300pb (Classe I) (verde); (b) após hibridação *in situ* com a sonda DNAr 5S de 1900pb (Classe II) (vermelho); (c)

resultado de Double-FISH demonstrando marcação com as duas sondas simultaneamente.....106

Figura 03 – Seqüências consenso de DNAr 5S Classe I (5S I) e Classe II (5S II) alinhadas da espécie *Potamotrygon motoro*. A região de transcrição se inicia no +1 e termina no +120 (está em negrito). As sequencias TATA-like estão contornadas por retângulos. A sequência nucleotídica grifada indica uma região microssatélite GCT_{10}. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos e gaps estão indicados pelos traços....107

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Sumário das informações citogenéticas disponíveis para espécies de raias de água salgada e água doce 07

Tabela 2 – Sistemas cromossômicos sexuais descritos em peixes Neotropicais 15

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3 – Espécies do gênero *Potamotrygon* utilizadas durante as análises citogenéticas e locais de coleta 18

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Análise da distância genética entre os clones da Classe I e os clones da Classe II; NC - número de clones; PB - número de bases; DG - divergência genética, DP - desvio padrão.....104

SUMÁRIO

1 Introdução Geral 01

1.1 Família Potamotrygonidae: aspectos taxonômicos e citogenéticos 01

1.2 Breve histórico da Citogenética de Peixes com ênfase em Elasmobrânquios 05

1.3 DNAs ribossômicos 45S e 5S 08

1.4 Evolução de mecanismos cromossômicos de determinação sexual 11

1.5 Cromossomos sexuais em peixes Neotropicais 12

2 Objetivos 17

3 Materiais 18

3.1 Área de estudo 18

4 Métodos 22

4.1 Métodos Citogenéticos 22

4.1.1 Estimulação de mitoses 22

4.1.2 Preparação de cromossomos mitóticos 22

4.1.3 Obtenção de cromossomos meióticos 23

4.1.4 Coloração convencional com Giemsa 24

4.1.5 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) 24

4.1.6 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C) 25

4.1.7 Bandamento com o fluorocromo base-específico Cromomicina A3 (CMA3) ... 26

4.1.8 Estudos cariotípicos 26

4.1.9 Medidas cromossômicas 27

4.1.10 Montagem dos cariótipos 27

4.2 Métodos Moleculares 27

4.2.1 Extração de DNA genômico 27

4.2.2 Caracterização do DNAr 5S 28

4.2.2.1 Isolamento do DNAr 5S por PCR.....28

4.2.3 Purificação dos fragmentos DNA em gel de agarose 29

4.2.4 Quantificação do DNA purificado 30

4.2.5 Clonagem das sequências de DNAr 5S obtidas por PCR 30

4.2.5.1 Ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pGEM-T.....30

4.2.5.2 Transformação de células competentes bacterianas 31

4.2.6 PCR para confirmação da presença de insertos 31

4.2.7 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes 32

4.2.8 Sequênciamento do DNA.....32

4.2.9 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) 34

5 Resultados e Discussão 38

5.1 Capítulo 1 - Descrição cariotípica e evidências de sistema múltiplo de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia superior do alto Paraná 39

5.2 Capítulo 2 - Mapeamento físico dos genes ribossomais 5S e 18S em *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)na bacia superior do alto Paraná.....65

5.3 Capítulo 3 - Organização molecular e mapeamento genômico de duas classes do gene do gene ribossomal 5S em *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) 84

6 Discussão Geral 102

7 Conclusões 107

8 Referências Bibliográficas 109

Introdução

Colônia de Pescadores – Porto Rico-PR

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE: ASPECTOS TAXONÔMICOS E CITOGENÉTICOS

Os Chondrichthyes são peixes caracterizados por apresentarem esqueleto cartilaginoso, estando o grupo atualmente organizado em duas Subclasses: Elasmobranchii, formada pelos tubarões e raias e Holocephali que abrange as quimeras (ORR, 1986; STORER *et al*. 1991).

Dentre os elasmobrânquios, as raias da família Potamotrygonidae, cuja classificação pode ser verificada a seguir, representam uma importante parte da ictiofauna neotropical, sendo os únicos componentes deste grupo totalmente restritos ao ambiente dulcícola (THORSON *et al*. 1978; COMPAGNON & COOK, 1995).

FILO: Chordata
SUB FILO: Vertebrata
CLASSE: Chondrichthyes
SUB CLASSE: Elasmobranchii
ORDEM: Myliobatiformes
FAMÍLIA: Potamotrygonidae

A família Potamotrygonidae compreende cerca de 21 espécies, distribuídas nos gêneros *Potamotrygon*, sendo para este gênero o maior em número de espécies descritas, *Potamotrygon boesemani, P. brachyura, P. castexi, P. costellata, P. dumerilli, P. falkneri, P. henlei, P. histrix, P. humerosa, P. leopoldi, P. magdalenae, P. motoro, P. ocellata, P. orbignyi, P. shroederi, P. schuemacheri, P. scobina, P. signata, P. yepezi* (ROSA, 1985, 2008), e os gêneros monotípicos, *Paratrygon (Paratrygon aiereba,* ROSA, 1985) e *Plesiotrygon* (*Plesiotrygon iwamae,* GARMAN, 1913 *apud* ROSA, 1985).

Os potamotrigonídeos apresentam boca, narinas e fendas branquiais totalmente ventrais e corpo achatado dorso-ventralmente, características estas

compartilhadas com os demais representantes de Myliobatiformes. A boca de Potamotrigonídeos possui dentes pequenos e pavimentosos (BRITSKI *et al.* 1999). Os olhos estão inseridos na face superior do disco, voltados lateralmente. As nadadeiras peitorais são carnosas e superdimensionadas, unindo-se anteriormente e formando um disco circular ou subcircular. As nadadeiras pélvicas têm formato triangular e ficam quase completamente escondidas pelas peitorais quando o animal repousa, exceção feita para *Plesiotrygon iwamae* (CARVALHO *et al.* 2003). Os machos dispõem de um par de clásperes, apêndices das nadadeiras pélvicas utilizados para a introdução do sêmen na cloaca da fêmea durante a cópula. Na cauda, superiormente, inserem-se os ferrões, em número variando de um a quatro, todos implantados no mesmo local. Os ferrões têm origem dérmica e parecem ser frequentemente substituídos (CARVALHO *et al.* 2003).

As raias da família Potamotrygonidae são restritas aos principais sistemas fluviais da América do Sul, incluindo rios da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (ACHENBACH & ACHENBACH, 1976; ROSA, 1985; CARVALHO *et al*. 2003).

No Brasil, a maior diversidade é encontrada na Bacia Amazônica, com cerca de 13 espécies (CHARVET-ALMEIDA *et al*. 2002). A região Nordeste do Brasil apresenta registros pontuais de representantes deste grupo, com referências de capturas nos Estados do Maranhão e Piauí (ROSA, 1985). Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, a Bacia Paraguai-Paraná abriga cerca de sete espécies nominais. Contudo, considera-se que esse número possa variar devido à possibilidade de existirem espécies sinônimas e/ou outras ainda não descritas (ROSA, 1985; CARVALHO *et al.* 2003).

No rio Paraná, até o final dos anos 70, a ocorrência de raias era assinalada apenas para os trechos situados à jusante das Cachoeiras de Sete-Quedas, uma importante barreira geográfica situada no Município de Guaíra, Estado do Paraná (VILELA *et al*. 2004). Com o fim do enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, no ano de 1982, esse obstáculo natural, que isolou por muito tempo a maioria dos componentes da ictiofauna do Alto Rio Paraná da fauna

remanescente dos sistemas à jusante, deixou de existir, possibilitando a colonização do trecho situado à montante de Guaíra por novas espécies. Nesse novo e extenso ambiente, as raias (*Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*) e outras espécies locais, além de espécies exóticas introduzidas posteriormente, como o tucunaré (*Cichla ocellaris*) e a corvina (*Plagioscion squamosissimus*), passaram a desempenhar o papel de espécies invasoras, provocando impactos de diferentes dimensões sobre a fauna aquática nativa, que ainda necessitam serem mais estudados e dimensionados (BRASIL, 1998; VILELA *et al.* 2004).

A captura de algumas espécies de raias já foi registrada nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Jupiá (foz do rio Tietê no Estado de São Paulo) e na região do baixo Paranapanema (BRITTO, 2004) e em Três Lagoas (Estado do Mato Grosso do Sul), sendo as espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* as de maior ocorrência (GARRONE, 2007).

Nesse período recente, o rio Paraná vem sendo intensamente modificado pela ação do homem, o que tem determinado sérias alterações na composição original da fauna e da flora desse ambiente. Dessa forma, estudos sobre o papel desempenhado por espécies invasoras como as raias, tornam-se relevantes, pois as informação obtidas possibilitariam a implantação de sistemas adequados de manejo desses ecossistemas e a própria preservação das espécies originais. Assim, o conhecimento sobre os potamotrigonídeos poderia ser utilizado como ferramenta importante para a adoção de medidas de conservação no alto curso do rio Paraná, com o desenvolvimento das metodologias necessárias nesses programas (SMITH & MARCIANO, 2000).

Na bacia do rio Paraná, a espécie *Potamotrygon motoro* (Figura 1), popularmente conhecida como “arraia-de-fogo” ou “arraia-pintada”, é atualmente considerada a mais abundante e amplamente distribuída, enquanto *P. falkneri*, (Figura 2) espécie de ocorrência também comum e denominada de “arraia branca” ou “arraia clarinha”, também vem sendo capturada em componentes hidrográficos dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul (CÂNDIDO-SILVA, 2006) e Estado de São Paulo (BRITTO, 2004; GARRONE, 2007).

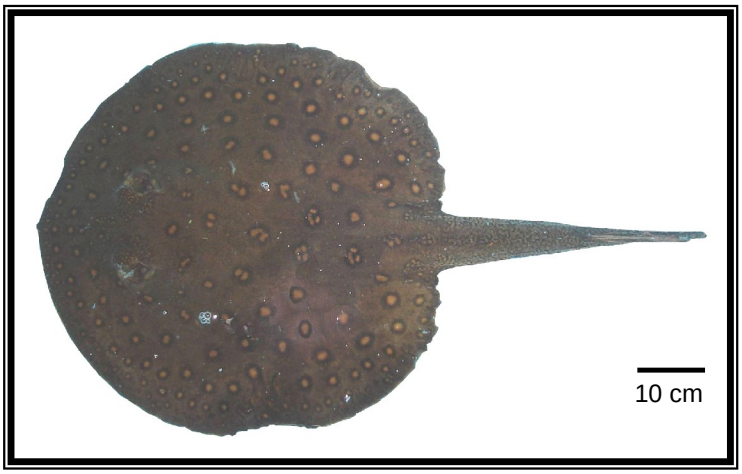


Figura 1 – Exemplar da espécie *Potamotrygon motoro* (Fêmea) de ocorrência na bacia superior do rio Paraná.

Figura 2 – Exemplar da espécie *Potamotrygon falkneri* (Macho) de ocorrência na bacia superior do rio Paraná.

As raias de água doce são peixes com pouca importância alimentar no Brasil. No entanto, o seu comércio como peixes ornamentais tem promovido um expressivo movimento na comercialização das espécies desse grupo, sendo exportadas anualmente cerca de 30.000 unidades de raias (ARAÚJO, 1999).

Seis espécies do gênero *Potamotrygon* (família Potamotrygonidae) são comercializadas regularmente como peixes ornamentais no estado do Amazonas: *P. motoro; P. orbignyi; P. schroederi; P. leopoldi; P. henlei* e *Potamotrygon* sp. (ARAÚJO, 1998). Os principais mercados para as espécies citadas são os Estados Unidos, Japão e Taiwan, onde são vendidas em lojas especializadas, usando um sistema de código denominado sistema - P ("P-number"). Neste sistema, cada código representa geralmente um padrão de coloração e não uma espécie nominal (ARAÚJO, 1999). Estima-se que a demanda internacional de exportação dessas espécies seja de 50.000 unidades/ano, tendo países como a Venezuela, Equador e Colômbia participação cada vez mais significativa nesse comércio (ARAÚJO, 1999).

1.2 BREVE HISTÓRICO DA CITOGENÉTICA DE PEIXES COM ÊNFASE EM ELASMOBRÂNQUIOS

Nas últimas décadas vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos em diferentes grupos de peixes utilizando diferentes técnicas citogenéticas como coloração com Giemsa, localização de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e bandamento C. Aliadas a estas técnicas de citogenética clássica, as análises citogenéticas moleculares através da técnica de hibridação *in situ*, levaram a um avanço na caracterização citogenética de muitas espécies no grupo dos peixes.

Através das técnicas de obtenção de cromossomos mitóticos, inicialmente adaptadas e descritas por BERTOLLO *et al*. (1978) e por FORESTI *et al*. (1981; 1993), tornou-se possível a implementação de técnicas de bandeamento cromossômicos em peixes, possibilitando identificar alterações numéricas e estruturais e possíveis relações evolutivas entre os diferentes grupos de espécies de peixes.

Estudos citogenéticos recentes vêm demonstrando a enorme variabilidade cariotípica dos peixes, tanto em relação ao número de cromossomos quanto à morfologia. Segundo ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2000b), dentre as espécies de peixes neotropicais já estudadas citogeneticamente, o número cromossômico pode variar de 2n=20 à 2n=134, podendo ser identificados tanto grupos de espécies com cariótipos bastante conservados, quanto grupos com cariótipos bastante variáveis. Dentre os peixes neotropicais, cerca de 706 espécies já foram cariotipadas (ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2000). Porém, levando-se em consideração que o número estimado de espécies de peixes para a região Neotropical pode chegar a 5000 (OLIVEIRA *et al.* 2006), estudos citogenéticos adicionais devem ser realizados visando maior conhecimento e caracterização da ictiofauna desta região.

Os Elasmobrânquios constituem provavelmente a classe de vertebrados menos estudada do ponto de vista da evolução sistemática (ROCCO *et al*. 2004). Apesar dos estudos citogenéticos nos peixes terem aumentado consideravelmente nos últimos tempos, os Chondrichthyes permanecem entre os grupos menos estudados, havendo poucos dados citogenéticos em peixes cartilaginosos, se considerarmos o fato de ser conhecida a morfologia cariotípica de apenas 6% das cerca de 1.100 espécies desse grupo viventes atualmente (STINGO & ROCCO, 2001).

Os dados citogenéticos sobre raias marinhas indicam a existência de uma variação no número diplóide de 2n=28 em *Narcine brasilians* (DONAHUE, 1974) à 2n=104 em *Raja meerdervoortei* (MAKINO, 1937). Já os poucos dados citogenéticos encontrados na literatura sobre raias de água doce da família Potamotrygonidae indicam que as espécies *Potamotrygon motoro* e *P. orbignyi* possuem o mesmo número diplóide de 2n=66 cromossomos, enquanto a espécie *Paratrygon aiereba* apresenta 2n=90 cromossomos (VALENTIN *et al.* 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Sumário das informações citogenéticas disponíveis para espécies de raias de água salgada e água doce.

Espécies	2N	Fórmula Cromossômica	N. F.	Referência
Torpedinidae				
Torpedo ocellata	66	12M/SM+54A	78	Stingo, 1979
Torpedo marmorata	86	86A	86	Stingo, 1979
Torpedo californica	82	4M/SM+78ST/A	86	Ida *et al.* 1985
Torpedo tokionis	86	86A	86	Asahida & Ida,1990
Narcinidae				
Narcines brasiliensis	28	28M/SM	56	Donahue, 1974
Myliobatidae				
Myliobatis Áquila	52	32M/SM+20A	84	Stingo & Capriglione 1986
Potamotrygon motoro	66	18M+12SM+10ST+26A	106	Valentim, F.C.S. *et al*. 2006
Potamotrygon orbignyi	66	22M+10ST+8ST+26A	106	Valentim, F.C.S. *et al*. 2006
Paratrygon aireba	90	4M+2SM+10ST+74A	106	Valentim, F.C.S. *et al*. 2006
Dasyatidae				
Taeniura lymma	64	38M/SM+26A	102	Rocco *et al.*,2002a
Dasyatis akajei	72	34M/SM+38A	106	Asahida *et al.* 1987
Dasyatis americana	78	9M/SM+69ST/A	87	Asahida *et al.*1993
Dasyatis matsubari	64	40M/SM+24ST/A	104	Asahida *et al.* 1990
Dasyatis Sabina	68	28M/SM+40ST/A	96	Donahue, 1974
Dasyatis sayi	68	34M/SM+34ST/A	102	Donahue, 1974
Dasyatis violácea	58	30M/SM+28ST/A	88	Olmo *et al.* 1982
Rhinobatidae				
Rhinobatos products	92	44M/SM+48A	136	Schwartz and Maddock, 1986
Rajidae				
Raja asterias	98	6M/SM+92A	104	Stingo and Capriglione, 1986
Raja polystigma	96	18M/SM+78ST/A	114	Rocco *et al.* 2006
Raja batis	98	98A	98	Nygren *et al*. 1971
Raja clavata	98	4M/SM+94ST/A	102	Stingo, 1979
Raja eglanteria	58	30M/SM+28ST/A	88	Schwartz and Maddock, 1986
Raja radiata	98	98ST/A	98	Nygren *et al.* 1971

Estudos recentes sobre a localização das regiões organizadoras de nucléolos com o uso da técnica de impregnação pelo nitrato de Prata evidenciaram Ag-RONs múltiplas e terminais nas espécies *Potamotrygon motoro* (7 cromossomos), *Potamotrygon orbignyi* (8 cromossomos) e *Paratrygon aiereba* (7 cromossomos) (VALENTIM *et al*. 2006). A mesma característica já havia sido evidenciada em outras espécies de raias, como *Torpedo ocellata* e *T. marmorata* por STINGO *et al.* (1995) e ROCCO *et al*. (2002b), indicando que esta poderia ser uma característica específica e conservada das espécies pertencentes à superordem Batoidea (ROCCO *et al*. 2004).

Um dos mais efetivos métodos de estudo citogenético de peixes cartilaginosos tem sido a combinação de técnicas clássicas de bandamento cromossômico, técnicas citogenéticas moleculares e hibridação *in situ* (ROCCO *et al*. 2006). Entre os peixes, tem sido verificado que, de modo bastante generalizado, os genes para RNAr 18S e RNAr 5S podem ser localizados em mais de um par de cromossomos (SCHMID *et al*. 1987; MARTINS & GALETTI, 1999; ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2000b; ROCCO *et al.* 2004, 2006).

1.3 DNAS RIBOSSÔMICOS 45S E 5S

Em eucariotos superiores, os genes para RNA ribossômicos (RNAr) encontram-se organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e pelo DNAr 5S, compostas por unidades repetidas “in tandem” com centenas a milhares de cópias (LONG & DAVID, 1980).

O DNAr 45S consiste de unidades transcricionais que codificam os RNAs ribossômicos 18S, 5.8S e 28S separadas por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não-transcritos (NTS) (LONG & DAVID, 1980). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Diversos trabalhos têm demonstrado que várias espécies de peixes apresentam somente dois cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos (GALETTI *et al.*

1984; VENERE & GALETTI, 1989; PAULS & BERTOLLO, 1990; MARTINS & GALETTI, 1997; entre outros), enquanto outras possuem múltiplos cromossomos portadores de RONs (GALETTI *et al.* 1985; FORESTI *et al.* 1989; SOLA *et al.* 1990, 1992; WASKO & GALETTI, 1999).

Como as regiões organizadoras de nucléolos podem constituir excelentes marcadores citogenéticos em peixes (GALETTI *et al*. 1984), estas têm sido comumente detectadas em várias espécies utilizando a técnica de coloração com nitrato de Prata (Ag-RON) e com os fluorocromos GC específicos mitramicina (MM) e cromomicina A_3 (CMA_3) (AMEMIYA & GOLD, 1988; PHILLIPS *et al*. 1988; GALETTI & RASCH, 1993; SOLA *et al*. 1997). A impregnação com nitrato de Prata tem sido a técnica mais utilizada em estudos de localização das regiões organizadoras de nucléolos, embora esta evidencie somente RONs transcricionalmente ativas (HOFGATNER *et al*. 1979; HOWELL & BLACK, 1980). Os fluorocromos MM e CMA_3, ao contrário, geralmente detectam tanto RONs ativas quanto inativas em peixes e anfíbios (MAYR *et al*. 1986; SCHMID & GUTTENBACH, 1988; PHILLIPS & HARTLEY, 1988), provavelmente como consequência do maior conteúdo de bases GC no DNAr (SCHMID & GUTTENBACH, 1988). Mais recentemente, a localização das regiões organizadoras de nucléolos tem sido confirmada através de hibridação *in situ* utilizando sondas de RNAr ou de DNAr 18S e DNAr 28S em cromossomos fixados de vários vertebrados, incluindo anfíbios, mamíferos (LONG & DAVID, 1980) e algumas espécies de peixes (PENDÁS *et al*. 1994a; CASTRO *et al*. 1996; VIÑAS *et al*. 1996; ABUÍN *et al*. 1996; MARTÍNEZ *et al.* 1996; GORNUNG *et al*. 1997, MARTINS & GALETTI, 1998; FISCHER *et al*. 2000 entre outros), uma vez que as regiões ricas em G-C, detectadas com MM e CMA_3 nem sempre identificam apenas regiões organizadoras de nucléolos.

O DNA ribossômico 5S, ao contrário do DNAr 45S, não está relacionado à formação dos nucléolos (LONG & DAVID, 1980). Este apresenta repetições que consistem de uma sequência codificante de 120 pares de bases e de um espaçador não-transcrito (NTS) que é comumente variável em sua sequência nucleotídica devido a inserções/deleções, mini-repetições e pseudogenes (LONG & DAVID,

1980). Embora a sequência nucleotídica do gene RNAr 5S seja altamente conservada mesmo entre espécies não relacionadas, as variações nos NTSs geralmente são espécie-específicas (SUZUKI *et al*. 1994; PENDÁS *et al*. 1995) e têm sido utilizadas com sucesso em estudos evolutivos (SUZUKI *et al*. 1994; UDOVICIC *et al*. 1995; CRONN *et al*. 1996; SAJDAK *et al*. 1998; CRISP *et al*. 1999; BAKER *et al*. 2000).

Em vários organismos, os genes RNAr 5S estão localizados em um único par cromossômico, enquanto as regiões organizadoras de nucléolos geralmente encontram-se presentes em múltiplos cromossomos (SUZUKI *et al*. 1996), em anfíbios (SCHMID *et al.* 1987; LUCCHINI *et al.* 1993) e algumas espécies de peixes (MORÁN *et al*. 1996; MURAKAMI & FUJITANI, 1998; MARTINS & GALETTI, 1999, 2000; WASKO *et al.* 2000 entre outros). Além disso, em peixes, os locos de DNAr 45S e DNAr 5S podem assumir uma organização sintênica no mesmo cromossomo (PENDÁS *et al.* 1994; MORÁN *et al*. 1996, ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2002), ou podem estar localizados em distintos pares cromossômicos (MARTÍNEZ *et al*. 1996; SAJDAK *at al*. 1998; MARTINS & GALETTI, 1999; BORN & BERTOLLO, 2000), o que parece ser a característica mais comumente observada entre os vertebrados (SUZUKI *et al*. 1996).

A localização cromossômica do DNAr 5S também tem sido reportada em muitas espécies de peixes (PENDÁS *et al.* 1994; MORÁN *et al.* 1996; MARTÍNEZ *et al.* 1996; FUJIWARA *et al*. 1998; SAJDAK *et al*. 1998; MARTINS & GALETTI, 1999, 2001; MURAKAMI & FUJITANI, 1998; GORNUNG *et al.* 2000; ROCCO *et al*. 2004; ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002), bem como as características da sua organização molecular (MARTINS *et al.* 2000; MESSIAS *et al.* 2003; ROCCO *et al.* 2004; MARTINS & WASKO, 2004; PICHIRI *et al.* 2006; PASOLINI *et al.* 2006; MORESCALCHI *et al*. 2008; entre outros). Assim, a ampliação de estudos envolvendo estes marcadores em espécies de peixes neotropicais mostra-se de grande interesse, tendo em vista a diversidade de espécies existentes nesta região.

1.4 EVOLUÇÃO DE MECANISMOS CROMOSSÔMICOS DE DETERMINAÇÃO SEXUAL

Os mecanismos de determinação sexual são variados e têm se mostrado bastante dinâmicos evolutivamente, provavelmente tendo se originados múltiplas vezes independentemente nos principais grupos de organismos (CHALESWORTH, 1991; VALLENDER & LAHN, 2006). Sobretudo nos grupos de vertebrados mais primitivos fica evidente a variabilidade evolutiva da determinação sexual, dada a ocorrência de diferentes sistemas múltiplos e formas de determinação sexual (BULL, 1980; EGGERT, 2004; VOLFF, 2005).

A ocorrência de cromossomos morfologicamente diferenciados na determinação sexual é relativamente comum em animais e rara em grupos vegetais. Em mamíferos, as fêmeas são homogaméticas por apresentarem duas cópias do cromossomo X, ao passo que os machos são heterogaméticos por possuírem um cromossomo X e um Y. Em aves, de modo geral, as fêmeas são heterogaméticas, portadoras de cromossomos designados Z e W e os machos são homogaméticos, portadores de dois cromossomos Z. Em nematóides, as fêmeas são XX e os machos apresentam apenas uma cópia do cromossomo sexual X, sendo este sistema designado X0 (RICE, 1996).

Peixes é o grupo mais diverso de vertebrados e é também o que possui maior variedade de mecanismos de determinação sexual (SCHARTL, 2004). A forma mais comum de reprodução sexuada em vertebrados envolve a produção de apenas um tipo de gameta por indivíduo, com a presença de dois sexos separados (gonocorismo), mas mesmo o hermafroditismo, raro nos demais vertebrados, é relativamente frequente em peixes, tendo sido observado em vinte e cinco famílias (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). O sexo é definido por uma ampla gama de mecanismos ambientais e/ou genéticos de determinação sexual (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). A determinação sexual ambiental pode depender de fatores físicos que definem o sexo já nas primeiras fases do desenvolvimento (como a temperatura ou pH) (JANZEN & PHILLIPS, 2006) ou mesmo de circunstâncias

sociais, como o estabelecimento de relações de dominância advindas do tamanho na época de maturação sexual (FRANCIS & BARLOW, 1993).

Em alguns grupos animais, notadamente em espécies de peixes, são observados mais de uma par de cromossomos sexuais, indicando a existência de mecanismos denominados múltiplos de determinação sexual, os quais acredita-se que sejam derivados dos sistemas simples XX/XY, ZZ/ZW ou XX/X0 (BULL, 1980; MOREIRA-FILHO *et al*. 1993).

Tem sido postulada a existência de dois mecanismos básicos no processo de origem e desenvolvimento de cromossomos sexuais diferenciados em vertebrados, a partir de cromossomos indiferenciados (BEÇAK e BEÇAK, 1969). Um primeiro, no qual a diferenciação desses cromossomos está relacionada primariamente à ocorrência de alterações cromossômicos estruturais (OHNO, 1967; BEÇAK e BEÇAK, 1969; MENGDEN e STOCK, 1980; BEÇAK, 1983) e um outro, no qual a diferenciação é resultado de um processo inicial de heterocromatinização em um dos cromossomos homólogos do par sexual (SCHIMID *et al.* 1979; SCHIMID, 1980). Em ambos os casos, esses eventos evitariam, ou pelo menos restringiriam a ocorrência da permuta entre os homólogos ou entre parte deles, o que constitui uma etapa essencial no processo de diferenciação dos cromossomos envolvidos na determinação sexual.

1.5 CROMOSSOMOS SEXUAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS

Os peixes representam um grupo extremamente heterogêneo quanto à determinação do sexo, apresentando desde determinação sexual em nível gênico, sem a distinção de cromossomos diferenciados, até a presença de cromossomos heteromórficos, representando complexos sistemas de determinação sexual (MORESCALCHI, 1992). A grande diversidade de sistemas cromossômicos relacionados ao sexo pode ser observada em estudos de peixes neotropicais, onde mais de 40 casos de cromossomos heteromórficos identificados, nada menos que 8 sistemas diferentes puderam ser detectados, ZZ/Z0, XX/X0, ZZ/ZW, XX/XY,

$Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_1$, ZZ/ZW_1W_2, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ E XX/XY_1Y_2 (MOREIRA-FILHO *et al*. 1993; ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2000b; ALMEIDA-TOLEDO e FORESTI, 2001; CENTOFANTE *et al.* 2002; ALVES *et al.* 2006; OLIVEIRA *et al*. 2006).

O número de espécies que apresentam cromossomos sexuais diferenciados tem aumentado significativamente nos últimos anos em decorrência tanto de um maior número de estudos citogenéticos em espécies neotropicais, quanto ao emprego de técnicas de bandamento cromossômico que permitem uma melhor identificação dos cromossomos homólogos.

Na literatura, os relatos de alterações cromossômicas estruturais envolvidas na formação de cromossomos sexuais são menos freqüentes que as ocorrências de eventos de heterocromatinização cromossômica.

Mecanismos primários de diferenciação morfológica de cromossomos sexuais em serpentes, segundo BEÇAK (1983), estariam relacionados a inversões pericêntricas, associadas ou não a eventos de deleção ou duplicação. MENGDEN & STOCK (1980) identificaram em *Acrantophis dumereli*, através da aplicação da técnica de Bandamento G, um sistema ZZ/ZW no qual o W corresponde a um cromossomo subtelocêntrico que poderia ter surgido de uma inversão pericêntrica em um dos elementos de um par de cromossomos metacêntricos homomórficos ancestral.

Em peixes encontramos algumas espécies da família Loricariidae que apresentam o sistema de determinação sexual ZZ/ZW e processos similares na formação do cromossomo W. Em *Loricariichthys platymetopon*, o surgimento do cromossomo W parece ter sido decorrente de uma inversão pericêntrica em um dos cromossomos de um par homomórfico (SCAVONE & JULIO Jr., 1995). Em *Hypostomus sp*., o W é um cromossomo metacêntrico, menor que o cromossomo Z (acrocêntrico), podendo ter-se originado a partir da ocorrência do mesmo evento anterior, seguido da deleção de um grande bloco de heterocromatina constitutiva (ARTONI *et al*. 1998).

Exemplos da ocorrência de processos de heterocromatinização na formação de cromossomos sexuais são relativamente freqüentes nos peixes.

Mecanismos nos quais a diferenciação sexual se dá pela presença de heterocromatina constitutiva no cromossomo Y ou W compõem a maioria dos casos nesse grupo animal. Entretanto, alguns estudos relatam em sistemas XX/XY, a presença de blocos de heterocromatina no cromossomo X e sua ausência no Y, como observado em *Salvelinus namaycush* (PHILLIPS & IHSSEN, 1985), em *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000) e em *Eigenmannia virescens* (ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2001).

Os sistemas múltiplos de determinação sexual provavelmente se originaram a partir de sistemas simples. Os mecanismo envolvidos em tal processo seriam a ocorrência de translocação recíproca envolvendo um dos cromossomos sexuais e um autossomo e a ocorrência de um rearranjo cromossômico denominado translocação Robertsoniana (GUERRA, 1988).

Casos de rearranjos cromossômica resultando em sistemas múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ foram descritos em uma espécie de Cyprinodontidae (UYENO & MILLER, 1971) em uma espécie de Goobeidae (UYENO & MILLER, 1972), em *Hoplias* sp. (Erythrinidae) (BERTOLLO *et al.* 1983), em *Eigenmania sp. 2* (Sternopygidae) (ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 1984).

A diversidade e a origem dos sistemas de cromossomos sexuais em peixes neotropicais têm sido geralmente associadas com a distribuição geográfica das espécies e com eventos geomórficos da América do Sul. (MOREIRA-FILHO *et al.* 1980; ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 2000b; ARTONI *et al.* 2001; CENTOFANTE *et al*. 2001).

A Tabela 2, apesar de não caracterizar uma revisão completa das ocorrências de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais, permite uma visualização geral da grande diversidade de sistemas existentes entre os peixes.

Tabela 2 - Sistemas cromossômicos sexuais descritos em peixes Neotropicais.

ORDEM/FAMÍLIA/ESPÉCIE	2n		SISTEMA	REF.
	F	M	CROMOSSÔMICO	
CHARACIFORMES				
Anostomidae				
Leporinus elongatus	54	54	ZZ/ZW	1,2
Leporinus obtusidens	54	54	ZZ/ZW	1,2
Leporinus reinhardti	54	54	ZZ/ZW	1,2
Leporinus macrocephalus	54	54	ZZ/ZW	2
Leporinus trifasciatus	54	54	ZZ/ZW	3, 4
Leporinus conirostris	54	54	ZZ/ZW	4
Leporinus cf. *elongatus*	54	54	ZZ/ZW	1
Leporinus cf. *brunneus*	54	54	ZZ/ZW	3
Leporinus sp.	54	54	ZZ/ZW	5
Characidae				
Triportheus albus	52	52	ZZ/ZW	6
Triportheus signatus	52	52	ZZ/ZW	6
Triportheus elongatus	52	52	ZZ/ZW	6
Triportheus cf. *elongatus*	52	52	ZZ/ZW	7, 8
Triportheus guentheri	52	52	ZZ/ZW	7, 8, 9
Triportheus flavus	52	52	ZZ/ZW	6
Triportheus paranense (MT)	52	52	ZZ/ZW	7, 8
Triportheus paranense (MS)	52	52	ZZ/ZW	7, 9
Triportheus paranense (Argentina)	52	52	ZZ/ZW	10
Gasteropelecidae				
Thoracocharax cf. *stellatus*	52	52	ZZ-ZW	11
Crenuchidae				
Characidium sp. aff. *C. gomesi*	50	50	ZZ/ZW	12
Characidium sp. cf. *C. alipioi*	50	50	ZZ/ZW	13
Characidium gomesi	50	50	ZZ/ZW	14
Erythrinidae				
Erythrinus erythrinus	52	51	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	15, 16
Hoplias cf. *lacerdae* (rio Pardo)	50	50	XX/XY	17
Hoplias cf. *malabaricus* (Vale R. Doce)	42	42	XX/XY	18, 19
Hoplias cf. *malabaricus* (rio Ribeira)	42	42	XX/XY	18
Hoplias cf. *malabaricus* (Alto Parana)	40	39	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	20, 21, 22
Hoplias cf. *malabaricus* (rio Aripuana)	40	41	XX/XY_1Y_2	20
Parodontidae				
Apareiodon affinis	55	54	ZZ/ZW_1W_2	23,24
Parodon hilarii	54	54	ZZ/ZW	25, 26
Parodon sp.	54	54	ZZ/ZW	27
Curimatidae				
Potamorhina squamoralevis	102	102	ZZ/ZW	28
Prochilodontidae				
Semaprochilodus taeniurus	54	54	ZZ/ZW	29
Cheirodontidae				
Cheirodon notomelas	52	52	ZZ/ZW	52
Cheirodon sp.	52	52	ZZ/ZW	52
Odontostilbe cf. microcephala	52	52	ZZ/ZW	30
SILURIFORMES				
Loricariidae				

Tabela 2 - Sistemas cromossômicos sexuais descritos em peixes Neotropicais. (Continuação)

ORDEM/FAMÍLIA/ESPÉCIE	2n		SISTEMA	REF.
	F	M	CROMOSSÔMICO	
Hisonotus sp. A	54	54	ZZ/ZW	31
Hypostomus ancistroides	68	68	XX/XY	32
Hypostomus sp.	64	64	ZZ/ZW	33
Hvpostomus macrops	68	68	XX/XY	32
Microlepdogaster leucofrenatus	54	54	ZZ/ZW	34
Pseudotocinclus tietensis	54	54	XX/XY	35
Loricariichthys platymetopon	54	54	ZZ/ZW	36
Ancistrus sp.	40	39	XX/X0	37
Doradidae				
Opsodoras sp.	58	58	ZZ/ZW	39, 3
Pimelodidae				
Steindachneridion sp.	56	56	XX/XY	40
Pimelodella sp.	46	46	XX/XY	41
GYMNOTIFORMES				
Sternopygidae				
Eigenmannia virescens			XX/XY	42
Eigenmannia virescens	38	38	ZZ/ZW	43
Eigenmannia sp.	32	31	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	44, 45
Brachyhypopomus pinnicaudatus			$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	53
Hypopomus sp.	42	41	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	46
CYPRINODONTIFORMES				
Cyprinodontidae				
Mexican anonymous species	48	47	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	47
Goodeidae				
Mexican anonymous species	48	46	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	48
Poeciliidae				
Poecilia reticulata	46	46	XX/XY	49
Gambusia puncticulata	48	48	ZZ/ZW	50
PERCIFORMES				
Gobiidae				
Awaous strigatus	46	45	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	54
Eleotridae				
Dormitator maculatus	48	48	XX/XY	55
CLUPEIFORMES				
Clupeidae				
Brevoortia aurea	46	45	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	51

Observação: Tabela adaptada de ALMEIDA-TOLEDO *et al*. (2001) e CENTOFANTE *et al*. (2002).

Referências: 1. MOLINA *et al.* (1998); 2. GALETTI Jr. e FORESTI (1987); 3. VENERE *et al*. (1998); 4. GALETTI Jr. *et al.* (1995); 5. VENERE *et al.* (2004); 6. FALCÃO (1988); 7. ARTONI *et al.* (2001); 8. ARTONI (1999); 9. BERTOLLO e CAVALLARO (1992); 10. SANCHEZ *et al.* (1999); 11. CARVALHO (2001); 12. MAISTRO *et al.* (1998); 13. CENTOFANTE *et al*. (2003); 14. CENTOFANTE *et al*. (2001); 15. MOLINA e BERTOLLO (1993); 16. SILVESTRO e MARGARIDO (2001); 17. BERTOLLO *et al.* (1978); 18. BERTOLLO *et al.* (1979); 19. BORN e BERTOLLO (2000); 20. BERTOLLO *et al*. (1983); 21. BERTOLLO *et al*. (1997); 22. BERTOLLO e MESTRINER (1998); 23. MOREIRA-FILHO *et al.* (1980); 24. JESUS (1996); JESUS *et al.* (2000); 25. MOREIRA-FILHO *et al.* (1993); 26. VICENTE (2001); 27. CENTOFANTE *et al.* (2002); 28. NAVARRETE e JULIO Jr. (1996); 29. FELDBERG *et al*. (1987); 30. SATO e MARTINS-SANTOS (1999); 31. ANDREATA (2002); 32. MICHELE *et al.* (1997); 33. ARTONI *et al.* (1998); 34. ANDREATA et a*l*. (1993); 35. ANDREATA *et al.* (1992); 36. SCAVONE e JULIO Jr. (1995); 37. ALVES *et al*. (2006); 38. VISSOTO *et al*. (1999); 39. VENERE e GALETTI Jr. (1998); 40. SWARÇA *et al.* (2003); 41. DIAS e FORESTI (1993); 42. ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (1988); 43. FORESTI (1987); 44. ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (1984); 45. ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2000b); 46. ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (1995); 47. UYENO e MILLER (1971); 48. YENO e MILLER (1972); 49. NANDA *et al.* (1990); 50. RAB (1984); 51. BRUM *et al*. (1992); 52. NISHIYAMA e MARTINS-SANTOS (1976); 53. ALMEIDA-TOLEDO (1998); 54. SOUZA (1998); 55. OLIVEIRA e ALMEIDA-TOLEDO (1985).

Objetivos

Rio Paraná – Próximo ao município de Ilha Solteira-SP.

2 OBJETIVOS

Considerando-se a relativa insuficiência de dados citogenéticos de representantes da família Potamotrygonidae e tendo em vista que as informações geradas nesta área poderiam servir de base para estudos populacionais e do processo de colonização desenvolvido pelas espécies deste grupo, o presente trabalho visa:

a) caracterizar citogeneticamente exemplares das espécies atualmente identificadas como *P. motoro* e *P. falkneri,* de ocorrência recente em componentes da bacia hidrográfica superior do rio Paraná, identificando seus números diplóides e fórmulas cariotípicas;

b) identificar o sistema de cromossomos sexuais em *P. motoro* e *P. falkneri;*

c) identificar os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva (Bandas C) nos cromossomos dessas espécies;

d) estabelecer a distribuição das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) nos cariótipos dos representantes dessas espécies, através da técnica de impregnação com nitrato de Prata (técnica Ag-RON);

e) identificar regiões ricas em G-C com o uso do fluorocromo CMA_3;

f) localizar os sítios de DNAr 5S e DNAr 18S nos cromossomos do complemento cariotípico das espécies com o uso da técnica de hibridação "*in situ*" fluorescente (FISH);

g) caracterizar a organização genômica do DNAr 5S através de clonagem e sequênciamento, dos fragmentos moleculares obtidos;

h) contribuir com informações cariotípicas para a taxonomia desse grupo, bem como para o conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de diversificação, no sentido de esclarecer possíveis relações evolutivas entre as espécies.

Material e Métodos

Pescador Gilmar, coletando raias com tarrafa, próximo ao município de Porto Rico-PR.

3 MATERIAIS

Foram estudados exemplares em diferentes amostragens das espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* na bacia superior do rio Paraná. Os exemplares coletados foram submetidos aos procedimentos citogenéticos para obtenção de preparações cromossômicas destas espécies. Sua posição taxonômica, localidade de coleta, o número e sexo dos exemplares analisados são mostrados na Tabela 3.

Após o processamento, todos os exemplares coletados foram fixados em formol 4%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Tabela 3 - Espécies do gênero *Potamotrygon* utilizadas durante as análises citogenéticas e locais de coleta.

Gênero/Espécie	**Número LBP**	**Número de espécimes** ♀ / ♂	**Localidade**	**Latitude/Longitude**
Potamotrygon				
P. motoro	5203 / 6716	10 / 13	rio Paraná, Alto Paraná, Porto Rico - PR	S 22° 47'42.4" W 53° 20'29.7"
	7503	3 / 4	rio Paraná, Alto Paraná, Ilha Solteira - SP	S 20° 47'42.4" W 51° 38'29.7"
P. falkneri	5202 / 6717	12 /14	rio Paraná, Alto Paraná, Porto Rico - PR	S 22° 47'42.4" W 53° 20'29.7"
	7503	3/5	rio Paraná, Alto Paraná, Ilha Solteira - SP	S 20° 47'42.4" W 51° 38'29.7"

3.1 ÁREA DE ESTUDO

No presente trabalho, as coletas foram realizadas no alto curso do rio Paraná (Figuras 3 e 4), nas regiões próximas ao município de Porto Rico-PR (22 º47' de latitude e 53º 20' de longitude) (Figura 5) e na região do reservatório da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dia (UHE Jupiá), situada na divisa entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (20º 47' de latitude e 51º38' de longitude), próximas ao município de Ilha Solteira (SP) (Figura 6).

As espécies foram coletadas utilizando fisga (arpão), espinhel e tarrafa. Indivíduos maiores, foram frequentemente capturados pelos espinhéis, nos quais foram utilizados anzóis maiores. A pesca com arpão, por motivos claros, só é possível em ambientes rasos e com elevada transparência.

A falta de resultados na captura de Potamotrygonidae com redes de espera pode ser explicada em parte pela forma do corpo dos indivíduos. O formato discóide, com amplas expansões laterais, dificulta ou impede a passagem do animal pela malha. Além disto, estas raias têm potencial para realizar movimentos laterais sobre um eixo vertical quando tocam uma rede. Desta forma, somente redes com grande distância entre nós poderiam capturar indivíduos pequenos, ainda assim com eficácia questionável.

Após serem coletados, os animais foram mantidos em piscinas aeradas até o momento de serem sacrificados para coleta do material de análise. Os tecidos utilizados para obtenção de preparações de cromossomos metafásicos foram rim, fígado, brânquias, baço e gônadas. Estudos anteriores demonstraram ser o baço o órgão com maior índice mitótico (VALENTIM *et al*. 2006). Os exemplares utilizados foram fixados em formol a 10%, posteriormente conservados em álcool etílico a 70%, fotografados para serem identificados pelo Prof. Dr. Marcelo Carvalho e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu (SP).

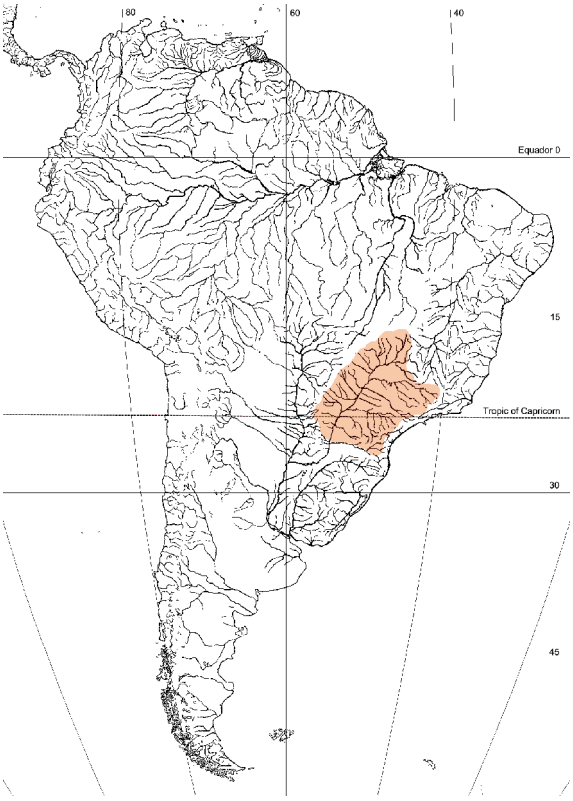
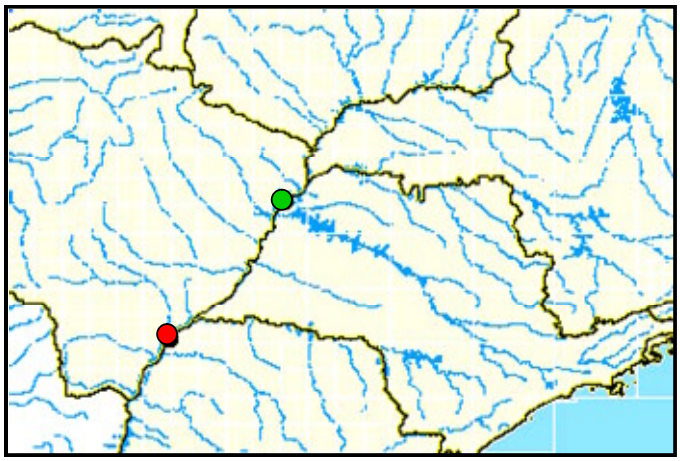


Figura 3 – Mapa hidrográfico da América do Sul, mostrando em destaque a bacia do rio Paraná.



População de Ilha Solteira-SP

População de Porto Rico-PR

Figura 4 – Mapa da bacia hidrográfica do Alto Paraná, evidenciando os locais de coleta das espécies *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*.

Figura 5 – Foto do local de coleta no rio Paraná, no município de Porto Rico-PR

Figura 6 – Foto do local de coleta no rio Paraná, no município de Ilha Solteira-SP.

4 MÉTODOS

4.1 MÉTODOS CITOGENÉTICOS

4.1.1 ESTIMULAÇÃO DE MITOSES

Para obtenção de um maior índice mitótico foi utilizada uma técnica de estimulação celular através da injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por COLE e LEAVENS (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por LEE E ELDER (1980) para pequenos mamíferos e adaptada por OLIVEIRA *et al.* (1988a) para peixes. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada.
2. Incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1ml por 100g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado por 48 ou 72 horas.

4.1.2 PREPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS

A técnica utilizada para obtenção de figuras mitóticas foi a descrita por FORESTI *et al*. (1981), com algumas modificações, que consiste em:

1. Injetar, intraperitonealmente, uma solução de colchicina 0,016% na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal. Deixá-lo nadando livremente por 4 horas.
2. Sacrificar o animal, retirando rins e brânquias.
3. Colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 7ml de solução hipotônica (KCl 0,075M).
4. Dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, primeiro deve-se dissociar o material com pinças de ponta fina e, depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur.

5. Retirar a suspensão celular da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrífuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 30 minutos.

6. Retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura. Deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente.

7. Adicionar mais cerca de 7ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (1000 ± 100rpm) por 10 minutos.

8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100rpm.

9. Repetir o item 8 mais uma vez.

10. Descartar o sobrenadante, ressuspender o precipitado em cerca de 1ml de fixador para preparo da suspensão final. Depositar 2 a 3 gotas da suspensão celular em lâminas de vidro limpas, deixar secar e corar com Giemsa.

11. Dividir a suspensão celular em duas alíquotas (cerca de 500µl), colocando-as em tubos de 1ml. Centrifugar (1000 ± 100rpm por 7 minutos) uma das alíquotas, descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em metanol absoluto. Estocar ambas as alíquotas a -80°C, para estudos posteriores.

4.1.3 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MEIÓTICOS

Para estudo dos cromossomos meióticos em suas diferentes fases foram utilizadas células gonadais masculinas, empregando-se a técnica descrita por KLINGERMAN & BLOOM (1977), adaptada para peixes por BERTOLLO *et al.* (1978). Após o seu sacrifício, os testículos são seccionados em fragmentos bem pequenos e colocados em solução hipotônica de KCL a 0,075M por 30 minutos.

O material é transferido para uma cubeta contendo fixador Carnoy 3:1 (Metanol:ácido acético), por 30 minutos. Após este período o fixador é substituído e este processo de fixação será repetido por mais duas vezes. Em seguida, o material é guardado em refrigerador a 4 C, em tubos tipo “Eppendorf”, com fixador Carnoy

para ser processado posteriormente. A preparação do material para análise consiste em retirar os fragmentos do fixador, secar em papel de filtro, colocar sobre uma lâmina limpa e macerá-la em 1 mL de ácido acético 50%, com o auxílio de um bastão de vidro.

Em seguida, a lâmina é colocada sobre uma placa aquecedora a 40°C para secar. Posteriormente, a preparação é corada com Giemsa 5% em tampão fosfato 0.06M e pH 6.8 por 10 minutos, lavada em água destilada e seca diretamente ao ar. Podem ser utilizados também indivíduos colchicinizados, porém a observação das fases da meioses será restrita as metáfases espermatogoniais, prófase I, metáfase I e prófase e metáfase II, uma vez que a colchicina bloqueara as demais fases.

4.1.4 COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM GIEMSA

As preparações cromossômicas depositadas nas lâminas passaram pelo seguinte processo de coloração:

1. hidrolisar o material contido na lâmina em HCl 1 N a 60°C por cerca de 3 minutos;
2. corar com solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos.

4.1.5 CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO (RONS)

Para obtenção das Regiões Organizadoras de Nucléolo, empregou-se a técnica de impregnação pela prata descrita por HOWELL E BLACK (1980), com algumas modificações. Foram utilizadas duas soluções:

Solução A: solução coloidal reveladora: 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.

Solução B: solução de nitrato de prata: 1g de $AgNO_3$ dissolvida em 2 ml de água destilada.

Essas soluções, uma vez preparadas, devem ser mantidas em frascos escuros, a 4 º C.

O procedimento para coloração das NORs é o seguinte:

1. hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60ºC;

2. secar as lâminas, pingar sobre o material uma gota da solução A, duas gotas da solução B e cobrir com lamínula;

3. deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60ºC por alguns minutos até que a mistura das soluções se torne marrom dourada.

4. lavar a lâmina em água destilada, deixar secar e corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por 30 segundos.

4.1.6 DETECÇÃO DA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (BANDA C)

Para obtenção de bandas C foi usada a técnica descrita originalmente por SUMNER (1972), que consiste em:

1. hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;

2. passar por uma solução de $Ba(OH)_2$ por cerca de 15 segundos e lavar em água destilada;

3. lavar em HCl 1N a 60ºC, lavando, em seguida, em água destilada;

4. incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH = 6,8), a 60ºC;

5. corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

4.1.7 BANDAMENTO COM O FLUOROCROMO BASE-ESPECÍFICO CROMOMICINA A3 (CMA3)

Para a detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC foi utilizada a técnica descrita por SCHWEIZER (1976) que emprega o corante Cromomicina A3 (CMA3). A técnica consiste em:

1.Colocar sobre as lâminas uma solução de tampão McIlvaine + MgCl2 e cobrir com lamínula. Incubar em placa de Petri umidecida com o mesmo tampão por 10 minutos;

2. retirar o tampão da lâmina cm pipeta Pasteur e, sem lavar as lâminas, secar a parte de trás das mesmas;

3. depositar as lâminas em placa de Petri, colocar 150 ml de cromomicina (0,5 mg/ml), cobrir com lamínulas lavadas em etano no momento do uso e deixar o conjunto dentro de uma caixa escura por 15 minutos;

4. retirar as lamínulas em tampão McIlvaine, lavando as lâminas vagarosamente nesta solução;

5. incubar as lâminas em solução methyl-green/hepes por 15 minutos;

6. Lavar as lâminas em solução de hepes/NaCl;

7. Secar as lâminas, pingar sobre elas uma gota de glicerol com propilgalato e depositar uma lamínula para montagem de uma lâmina permanente;

8. deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 20 dias antes da análise;

9. observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

4.1.8 ESTUDOS CARIOTÍPICOS

A partir dos dados obtidos através das análises e contagens dos cromossomos em cerca de 20 metáfases em cada indivíduo estudado, foi estabelecido um número diplóide modal para os exemplares de cada espécie.

Assim sendo, as melhores metáfases, bem como as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos, foram fotografadas em fotomicroscópio óptico Olympus, com objetiva de imersão de 100x, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu. As imagens foram capturadas com o uso do programa Image Pro Plus versão 6.0 para Windows (Media Cybernetics).

4.1.9 MEDIDAS CROMOSSÔMICAS

Os cariótipos foram montados com o auxílio do programa Adobe Photoshop versão 7.0.1. Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por LEVAN *et al.* (1964), e foram classificados em : metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,70 a 3,00), subtelocêntricos (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

4.1.10 MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o numero de cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos e organizados em ordem decrescente de tamanho, para a disposição final do cariótipo.

4.2 MÉTODOS MOLECULARES

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA).

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO DNAR 5S

Seqüências de DNAr 5S foram isoladas do DNA genômico de exemplares de *Potamotrygon motoro*, clonadas, submetidas ao sequênciamento nucleotídico, e usadas como sondas para hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

4.2.2.1 ISOLAMENTO DO DNAR 5S POR PCR

O DNAr 5S foi isolado por PCR com o uso dos *primers* 5SA (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3') e 5SB (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC-3'), propostos por PENDÁS *et al*. (1994). Esses *primers* amplificam os genes DNAr 5S e seus espaçadores não transcritos (NTS).

Para cada amostra a ser amplificada, foi preparada a seguinte reação (*mix*):

Primer F (10µM)	0,5 µl
Primer R (10µM)	0,5 µl
dNTP (8mM)	0,5 µl
Taq (5U/µl)	0,1 µl
Tampão (10x)	2,5 µl
$MgCl_2$ (50mM)	0,5 µl
DNA (cerca de 50ng de DNA genômico)	1,0 µl
Água estéril	19,4 µl
Volume total	25 µl

As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc.). O programa utilizado para a amplificação do gene DNAr 5S consiste em:

94°C ---- 5 min
35 ciclos { 95°C ---- 45 seg
65ºC ---- 30 seg
72ºC ---- 1 min
72°C ---- 7 min
Manutenção a 4°C

Checar o produto do PCR em gel de agarose a 1,0 %.

4.2.3 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DNA EM GEL DE AGAROSE

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse em gel de agarose foi realizada, para posterior clonagem dos mesmos, utilizando o Kit GE – Amersham Biosciences (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante.

Processamento dos fragmentos de DNA em gel de agarose

1. Pesar um tubo de 1,5ml vazio e anotar o peso.
2. Cortar a banda de interesse do gel de agarose e colocá-la no tubo. Cortar o pedaço de gel em vários pedaços menores, utilizando uma tesoura ou uma pinça.
3. Pesar novamente o tubo e calcular o peso da amostra. Adicionar 10µl de *Capture Buffer* para cada 10mg de gel, misturar no vórtex e incubar a 60°C em banho-maria até que a esteja dissolvida.

Ligação do DNA

4. Colocar a minicoluna no tubo de coleta.
5. Transferir a banda processada para a minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
6. Centrifugar a 13000xg por 1 minuto. Retirar a minicoluna do tubo de coleta e descartar o conteúdo desse. Colocar novamente a minicoluna no tubo de coleta.

Lavagem

7. Adicionar 700µl de *Wash Buffer*. Centrifugar a 16000xg por 1 minuto. Retirar a minicoluna do tubo de coleta e descartar o conteúdo desse. Colocar novamente a minicoluna no tubo de coleta.
8. Repetir o passo anterior com 500µl de *Wash Buffer*. Centrifugar a 16000xg por 1 minuto.
9. Esvaziar o tubo de coleta e centrifugar novamente por 1 minuto para permitir evaporação de qualquer resíduo de etanol.

Eluição

10. Transferir cuidadosamente a minicoluna para um tubo de 1,5ml limpo.
11. Adicionar 20µl de água livre de nuclease à minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 16000xg por 1 minuto.
12. Descartar a minicoluna e estocar o DNA a 4°C ou -20°C.

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA PURIFICADO

A concentração das amostras de DNA purificadas foi estimada em um Nanodrop ND-1000 Espectophotometer.

4.2.5 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE DNAR 5S OBTIDAS POR PCR

A clonagem do DNAr 5S foi realizada para a posterior caracterização destes segmentos de DNA. O kit de ligação *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega) foi utilizado para ligação dos fragmentos de interesse ao plasmídeo pGEM-T, seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5a preparadas no próprio laboratório.

4.2.5.1 Ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pGEM-T

Em um tubo de 0.5mL, adicionar 2µl do inserto de interesse (fragmento de DNA), 1µl de T4 DNA ligase, 1µlde tampão de reação 10X, 1µl do plasmídeo pGEM-

T (50ng) e 5µlde água destilada autoclavada. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12-16 horas. Utilizar nas reações de transformação bacteriana.

4.2.5.2 Transformação de células competentes bacterianas

Colocar 50µl de bactérias competentes (acondicionadas a -70°C) em um tubo de 1.5ml e, posteriormente, adicionar 10µl da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter o tubo no gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37°C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950µl de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7,5) a temperatura ambiente e incubar a 37°C por 1 hora, sob agitação a 225 rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5), contendo 2µl de ampicilina (50mg/ml) por mililitro de meio LB e 50µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-(-Dgalactoside) (50mg/ml), para posterior seleção dos plasmídeos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37ºC durante 12-16 horas. A presença de insertos de interesse nos plasmídios recombinantes foi checada por PCR e os clones recombinantes resultantes estocados em glicerol 70% e armazenados em freezer a -70°C.

4.2.6 PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE INSERTOS

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR) com o uso dos *primers* M13F (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') e M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'). Em um tubo de 0.5ml, adicionar ao *mix* de reagentes descrito abaixo uma fração de DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de uma ponteira.

Primer F (10µM)	0,5 µl
Primer R (10µM)	0,5 µl
dNTP (8mM)	0,5 µl
Taq (5U/µl)	0,1 µl
Tampão (10x)	2,5 µl
$MgCl_2$ (50mM)	0,5 µl
Água estéril	20,4 µl
Volume total	25 µl

Realizar o PCR de acordo com o seguinte programa:

95ºC ---- 3 min
34 ciclos { 95ºC ---- 30 seg
50ºC ---- 1 min
72ºC ---- 2 min
72ºC ---- 5 min

Checar os produtos em gel de agarose a 1%.

4.2.7 CRESCIMENTO E ESTOCAGEM DOS CLONES RECOMBINANTES

As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio L.B - sólido contendo ampicilina e X-gal. A placa foi deixada na estufa a 37°C *overnight*. As colônias recombinantes de interesse foram retiradas com tips estéreis e inoculadas em 5ml de meio L.B. líquido contendo ampicilina.

4.2.8 SEQUÊNCIAMENTO DO DNA

Os *primers* utilizados na reação de PCR de sequênciamento foram o M13F e M13R para os produtos clonados. Foram feitas duas réplicas do *primer* forward para cada produto de PCR purificado.

PCR de sequênciamento

O kit de sequênciamento utilizado o DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Bioscience), como descrito a seguir:

Para cada amostra a ser seqüenciada, preparar a reação (mix):

Pré-Mix (Kit)	2 μl
Primer F ou R (3,3 mMol)	1 μl
DNA*	até 5 μl
Água estéril	X μl
Volume total	9μl

*Concentração final = 200-500ηg para plasmídeo ou 40-100ηg para DNA purificado

Os parâmetros utilizados para o PCR de sequênciamento são:

96ºC ---- 2 min

34 ciclos { 96ºC ---- 45 seg
50ºC ---- 30 seg
60ºC ---- 4 min }

4ºC ---- manutenção

Purificação do DNA amplificado na reação de sequênciamento

Após o final da amplificação procedeu-se, como descrito abaixo, a purificação das amostras visando a eliminação dos nucleotídeos terminadores não incorporados:

1. Adicionar 2μl de acetato de sódio 3M e 80 μl de etanol 95% em temperatura ambiente em cada tubo contendo o produto de sequênciamento.
2. Misturar no vórtex rapidamente e centrifugar a 20ºC por 30 minutos a 14000g. Remover o sobrenadante cuidadosamente por aspiração.
3. Adicionar 400 μl de etanol 70% em temperatura ambiente e, em seguida centrifugar a 20ºC por 5 minutos a 14000g.

4. Descartar cuidadosamente o sobrenadante por aspiração e deixar o *pellet* secar por uma hora em temperatura ambiente protegido da luz. O *pellet* seco pode ficar guardado por um mês a 4°C protegido da luz.

Análise das amostras em seqüenciador ABI prism 377

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas num seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer).

Edição das seqüências

As seqüências foram processadas retirando-se as regiões dos plasmídios e uma busca por similaridades foi realizada através do sistema de pesquisa BLASTN (ALTSCHUL *et al.,*1990) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se os programas BIOEDIT (HALL, 1999) e DAMBE (XIA & XIE, 2001), sendo o alinhamento checado manualmente.

4.2.9 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

As sondas utilizadas na hibricação *in situ* foram: seqüências do DNAr 5S, isoladas por PCR a partir do DNA nuclear de *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI JR, 1999) e sequências de DNAr 18S, obtida por PCR a partir do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA E GALETTI JR, 2005).

Marcação da sonda

As sondas de DNAr 5S isoladas por PCR, foram marcadas pelo método de nick translation com o uso do kit “BioNick™ Labeling System” (Invitrogen).

Para cada lamina, preparar a seguinte reação:

dNTP mix (Kit)	1μl
Enzima mix (Kit)	1 μl
DNA (200μg/μl)	1 μl
Água estéril	X μl
volume total	9μl

Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a 16°C.

Parar a reação com a adição de 1μl de *Stop Buffer*. Acrescentar à reação, 1/10 do volume (1μl) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22μl) de etanol 100% gelado. Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70º C por 1 hora. Centrifugar por 15 minutos a 15.000rpm a 4º C. Descartar o sobrenadante e adicionar 50μL de etanol 70% gelado. Centrifugar por 5 minutos a 15.000rpm a 4º C. Descartar sobrenadante com cuidado e deixar secar. Ressuspender em 6μL de água Milli Q.

A sonda de DNAr 18S foi marcada por PCR de acordo com a seguinte reação:

Água milli-Q autoclavada para marcação com biotina ou Água milli-Q autoclavada para marcação com digoxigenina	29,5μl ou 29,2μl
Tampão da enzima (10x)	5,0μl
$MgCl_2$ (50mM)	4,0μl
dATP (2mM)	1,0μl
dCTP (2mM)	1,0μl
dGTP (2mM)	1,0μl
dTTP (2mM) para marcação com biotina ou dTTP (2mM) para marcação com digoxigenina	0,5μl ou 0,6μl
Biotina-16-dUTP (1mM) ou Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0,5μl ou 0,7μl
Primer F (2mM)	2,5μl
Primer R (2mM)	2,5μl
Taq (5U/μl)	0,5μl
Produto da 2ª PC	2,0μl

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

94ºC ---- 5 min

34 ciclos { 95ºC ---- 1 min
63ºC ---- 1 min
72ºC ---- 1 min e 30 seg }

72ºC ---- 5 min

4ºC ---- manutenção

O produto de PCR (cerca de 1800pb) foi digerido com 3µl de DNase (0,005U/µl) por 15 minutos a 15ºC, incubado por 10 minjutos a 90ºC para a inativação da DNase e em seguida precipitado, como consta no protocolo de SCOMP.

Preparação das lâminas

Lavar as lâminas contendo as preparações cromossômicas em PBS 1x por 5 minutos a temperatura ambiente. Desidratar em uma série de etanol a 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho a temperatura ambiente. Tratar com uma solução de RNAse (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37ºC. Lavar duas vezes em solução de 2xSSC por 10 minutos e em PBS 1x por 5 minutos. Tratar com pepsina 0,005% em 10 mM de HCl por 10 minutos a 37ºC. Lavar em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, fixar com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl2 50mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar em PBS 1x por 5 minutos e desidratar em série de etanol a 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho a temperatura ambiente. Desnaturar as lâminas em formamida 70% dissolvida em 2xSSC a 70ºC por 2-5 minutos. Desidratar novamente em série de etanol a 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho.

Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

1. Preparar a solução de hibridação. Em um tubo de 0,6ml contendo 6 ul da sonda, adicionar 15µl de formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Desnaturar a sonda a 100º C por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo.

2. Colocar 30μL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37º C overnight.

3. Decorrido este tempo, lavar as lâminas 2 vezes em solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 10 minutos cada (com agitação).

4. Lavar as lâminas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada (com agitação).

5. Lavar Tween 0,5% em 4xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente (com agitação).

6. Incubar as lâminas NFDM 5% em 4xSSC por 15 minutos.

7. Lavar as lâminas 2 vezes em Tween 0,5% em 4xSSC a temperatura ambiente (com agitação).

8. Detectar as sondas marcadas com biotina com 30µl de avidina-FITC (4µl de FITC 10ng/µl + 26µl de NDFM) ou com digoxigenina com 30µl de antidigoxigenina rodamina (4µl de antidigoxi 10ng/µl + 26µl de NDFM) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Detectar a dupla FISH com 4µl de FITC + 4µl de antidigoxi + 22 µl de NDFM por 1 hora a 37°C em câmara úmida.

9. Lavar as lâminas 3 vezes em Tween 0,5% em 4xSSC por 5 minutos (com agitação).

10. Desidratar as lâminas em série de álcool 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho. Secar.

11. Montar a lâmina com 20μl de antifade (VectaShield, Vector Laboratories, Inc.) + 0,7 de iodeto de propídio (50μg/mL) ou com antifade/DAPI (VectaShield, Vector Laboratories, Inc.) e cobrir com lamínula. Guardar a +4° C por poucos dias, ou então a –20° C permanentemente antes ou após a análise.

Resultados e Discussão

Técnico de laboratório coletando raias com fisga, próximo ao município de Porto Rico-PR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões especificas dos dados obtidos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de Capítulos, referentes a possíveis trabalhos que serão submetidos à publicação em revistas científicas.

Capítulo 1 – Descrição cariotípica e evidências de sistema múltiplo de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia superior do alto Paraná.

Capítulo 2 – Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).

Capítulo 3 – Organização molecular e mapeamento genômico de duas classes de DNAr 5S em *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).

CAPÍTULO 1

DESCRIÇÃO CARIOTÍPICA E EVIDÊNCIAS DE SISTEMA MÚLTIPLO DE CROMOSSOMOS SEXUAIS $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ EM *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (CHONDRICHTHYES: POTAMOTRYGONIDAE) NA BACIA SUPERIOR DO ALTO PARANÁ.

RESUMO

As raias da família Potamotrygonidae são encontradas nos principais sistemas fluviais da América do Sul. No Brasil, o maior número de espécies é encontrado na Bacia Amazônica (cerca de 13 espécies), além de outras em descrição e/ou ainda não descritas. Considerando a escassês de informações cariotípicas de representantes da família Potamotrygonidae, o presente estudo teve como objetivo a descrição cariotípica de populações de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* da bacia hidrográfica do Alto Paraná, nas regiões de Porto Rico – PR e Ilha Solteira – SP. As técnicas citogenéticas utilizadas foram a estimulação mitótica e meiótica, coloração convencional com Giemsa, detecção das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs), e identificação dos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva (Banda C). As duas espécies em estudo apresentaram um heteromorfismo cromossômico, sendo as fêmeas portadoras de 2n=66 cromossomos e os machos 2n=65 cromossomos, identificando a ocorrência de um sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ confirmada com estudos citogenéticos da meiose. As regiões organizadoras de nucléolos identificadas pela reação Ag-RON, evidenciaram marcações múltiplas em ambas as espécies, com variações de 5 a 7 RONs. A técnica de bandamento C, revelou a presença de blocos heterocromáticos localizados nas regiões centromérica em quase todos os cromossomos nas duas espécies em estudo. Através do presente estudo foi evidenciada uma heterogeneidade nos cariótipos, permitindo sugerir que rearranjos cromossômicos, como inversões e/ou translocações, ocorreram durante a evolução cromossômica nas duas espécies desse gênero.

INTRODUÇÃO

Os Elasmobrânquios constituem provavelmente a classe de vertebrados menos estudada no ponto de vista da evolução sistemática (ROCCO *et al*. 2004). Apesar dos estudos citogenéticos nos peixes terem aumentado consideravelmente nos últimos tempos, os Chondrichthyes permanecem entre os grupos menos estudados, havendo poucos dados citogenéticos em peixes cartilaginosos, se considerarmos o fato de ser conhecida a morfologia cariotípica de apenas 6% das cerca de 1.100 espécies desse grupo viventes atualmente (STINGO & ROCCO, 2001).

Os dados citogenéticos sobre raias marinhas indicam a existência de uma variação no número diplóide de 2n=28 em *Narcine brasilians* (DONAHUE, 1974) à 2n=104 em *Raja meerdervoortei* (MAKINO, 1937). Já os poucos dados citogenéticos encontrados na literatura sobre raias de água doce da família Potamotrygonidae indicam que as espécies *Potamotrygon motoro* e *P. orbignyi* possuem o mesmo número diplóide de 2n=66 cromossomos, enquanto a espécie *Paratrygon aiereba* apresenta 2n=90 cromossomos (VALENTIN *et al.* 2006)

Os estudos citogenéticos com raias de água doce não relatam a ocorrência de sistemas de cromossomo sexual heteromórficos neste grupo, embora os peixes representem um grupo extremamente heterogêneo quanto a determinação do sexo, ocorrendo desde a determinação sexual em nível gênico, sem a distinção de cromossomos diferenciados, até a presença de cromossomos heteromórficos, representando complexos sistemas de determinação sexual (MORESCALCHI, 1992; SCHARTL, 1995). Entretanto, as espécies que apresentam cromossomos morfológicamente distintos demonstram uma grande variabilidade de sistemas que ocorrem principalmente, em peixes da região Neotropical (MOREIRA-FILHO *et al.* 1993; ALMEIDA-TOLEDO e FORESTI, 2001).

O presente estudo teve como objetivo investigar a estrutura cariotípica de populações de *P. motoro* e *P. falkneri*, bem como identificar as diferenças

cromossômicas envolvidas no processo de diversificação destas espécies com a aplicação de metodologias de bandamento cromossômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados estudos citogenéticos em exemplares das espécies de raias *P. motoro* e *P. falkneri* provenientes da bacia hidrográfica do alto Paraná, nas regiões de Porto Rico – PR (S 22° 47' 42.4" W 53° 20; 29.7") e Ilha Solteira – SP (20°47'42.4" W 51° 38'29.7"). Foram coletados 30 exemplares de *P. motoro*, tendo sido analisados 10 fêmeas e 13 machos da região de Porto Rico e 3 fêmeas e 4 machos de Ilha Solteira. Foram coletados 34 exemplares de *P. falkneri*, sendo 12 fêmeas e 14 machos capturados em Porto Rico e 3 fêmeas e 5 machos em Ilha Solteira, coletados entre os anos de 2007 e 2008.

Cromossomos mitóticos foram obtidos segundo o protocolo descrito por FORESTI *et al.* (1981), com algumas adaptações para raias de água doce. Metáfases meióticas foram obtidas pela técnica descrita e adaptada para peixes por BERTOLLO *et al.* (1978), com algumas modificações. A montagem do cariótipo foi realizada de acordo com LEVAN *et al*. (1964).

Regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram identificadas no complemento cromossômico utilizando a técnica de coloração por nitrato de Prata desenvolvida por HOWELL & BLACK (1980) e os padrões de heterocromatina constitutiva nas preparações cromossômicas foram obtidos segundo o método proposto por SUMMER (1972).

RESULTADOS

As espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* apresentaram 2n=66 cromossomos nas fêmeas e 2n=65 cromossomos nos machos, este heteromorfismo cromossômico encontrado, é devido à ocorrência de sistema de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, como evidenciado também pelos

dados de meiose. As duas populações analisadas de *P. motoro* apresentaram números fundamentais diferentes (Tabela 4), sendo que as fêmeas da população de Porto Rico apresentaram número fundamental de 116, constituído por 22 cromossomos metacêntricos, 8 cromossomos submetacêntricos, 20 cromossomos subtelocêntricos e 16 cromossomos acrocêntricos (Figura 7), os machos da população de Porto Rico apresentaram número fundamental de 114, constituído por 21 cromossomos metacêntricos, 9 cromossomos submetacêntricos, 19 cromossomos subtelocêntricos e 16 cromossomos acrocêntricos (Figura 8). Na população de Ilha Solteira as fêmeas apresentaram número fundamental de 122, constituído por 20 cromossomos metacêntricos, 10 cromossomos submetacêntricos, 26 cromossomos subtelocêntricos e 10 cromossomos acrocêntricos (Figura 9), os machos apresentaram número fundamental de 120, constituído por 19 cromossomos metacêntricos, 11 cromossomos submetacêntricos, 25 cromossomos subtelocêntricos e 10 cromossomos acrocêntricos (Figura 10).

A espécie *Potamotrygon falkneri* também apresentou números fundamentais diferentes em ambas as populações (Tabela 4). Na população de Porto Rico o número fundamental encontrado nas fêmeas é 110, constituído por 20 cromossomos metacêntricos, 10 cromossomos submetacêntricos, 14 cromossomos subtelocêntricos e 22 cromossomos acrocêntricos (Figura 11), os machos da população de Porto Rico apresentaram número fundamental de 108, constituído por 19 cromossomos metacêntricos, 10 cromossomos submetacêntricos, 14 cromossomos subtelocêntricos e 22 cromossomos acrocêntricos (Figura 12). Na população de Ilha Solteira o número fundamental encontrado nas fêmeas é 114, constituído por 20 cromossomos metacêntricos, 10 cromossomos submetacêntricos, 18 cromossomos subtelocêntricos e 18 cromossomos acrocêntricos (Figura 13), os machos apresentaram número fundamental de 112, constituído por 19 cromossomos metacêntricos, 10 cromossomos submetacêntricos, 18 cromossomos subtelocêntricos e 18 cromossomos acrocêntricos (Figura 14).

As análises em preparações meióticas de indivíduos machos de *P. falkneri* revelaram a presença de um trivalente, além dos 30 bivalentes, na figura de metáfase I (Figura 15), indicando a ocorrência de heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo.

A análise do padrão de bandamento C, mostrou que as espécies *P. motoro* (Figura 7b,8b,9b,10b) e *P. falkneri* (Figura 11b,12b,13b,14b) apresentam grandes segmentos banda C positivos localizados em posição centromérica na maioria dos cromossomos do complemento.

As análises realizadas com a aplicação da técnica de Ag-RONs mostraram a presença de marcações nucleolares múltiplas nas duas espécies. Em *P. motoro* a população de Porto Rico evidenciou marcações nas posições terminais de sete cromossomos, identificadas no braço curto do par dois, no braço curto em um dos homólogos do par quatro, nos braços longos do par seis, no braço longo em um dos homólogos do par dezesseis, e em um dos homólogos do par vinte e seis (Figura 16a). A população de Ilha Solteira evidenciou marcações nas posições terminais de seis cromossomos, sendo no braço curto do par dois, no braço longo em um dos homólogos do par seis, nos braços longos do par vinte, e em um dos homólogos do par vinte e seis (Figura 16b). Em *P. falkneri* a população de Porto Rico apresentou marcações nas posições terminais em seis cromossomos metacêntricos e um cromossomo acrocêntrico (Figura 16c). Na população de Ilha Solteira, as marcações foram encontradas também nas posições terminais em cinco cromossomos metacêntricos e dois cromossomos acrocêntricos (Figura 16d).

DISCUSSÃO

Apesar de muitas espécies de vertebrados apresentarem cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados entre fêmeas e machos, a maioria das espécies de peixes não apresenta qualquer diferença cromossômica entre os sexos e, como consequência, existe grande dificuldade de se proceder à identificação dos sexos por meio de análises cariotípicas.

No presente estudo, ambas as populações de P*otamotrygon motoro* e *P. falkneri*, apresentaram o número diplóide de 2n=66 cromossomos nas fêmeas, e 2n=65 cromossomos nos machos. Essa alteração no número cromossômico é devido à ocorrência de um sistema múltiplo de determinação sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$.

As duas espécies de raias, apesar de apresentarem o mesmo número diplóide, apresentam cariótipos bem heterogêneos, e com distribuição comparável de segmentos banda C positivos nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos, como já evidenciado por VALENTIM *et al.* (2006) em *P. motoro, P. orbignyi e Paratrygon aiereba*.

Em algumas espécies de peixes como em *Hoplias malabaricus* (BETOLLO *et al.* 1997, 1998) e em *Characidium* sp. (ARTONI & BERTOLLO, 2002; PANSONATO, J.C. 2006), os cromossomos sexuais são facilmente identificados através de técnicas como bandamento C. Contudo, no presente estudo não foi possível identificar os cromossomos envolvidos na determinação sexual através dos padrões de heterocromatina constitutiva obtidos para *P. motoro* e *P. falkneri*.

As populações de *P. motoro* analisadas apresentaram fórmulas cariotípicas e números fundamentais diferentes, sendo que a população de Ilha Solteira mostrou uma fórmula cariotípica bastante distinta das demais populações, devido à presença de diferentes números de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos.

Nas comparações do cariótipo de *P. falkneri* em relação ao cariótipo de *P. motoro*, a primeira apresentou um número maior de cromossomos acrocêntricos. As variações encontradas no número fundamental (NF) podem ser resultados de rearranjos cromossômicos, principalmente do tipo fusão, fissão, translocações, inversões pericêntricas, que podem ser considerados como mecanismos importante de diversificação e evolução cariotípica em peixes (WASKO *et al.* 1996; WASKO e GALETTI, 1998; entre outros).

As RONs analisadas em *P. motoro* e *P. falkneri*, apresentaram-se variando de cinco à sete cromossomos, sempre em regiões terminais e de

tamanhos semelhantes entre si, sendo portanto homomórficas quanto a esse caráter. Casos de RONs múltiplas já foram evidenciados em outras espécies de raias (VALENTIN *et al*. 2006) e em outras espécies de peixes, como em Serrasalminae (GALETTI, SILVA e CERMINARO, 1985b; CESTARI & GALETTI, 1992a; NAKAYAMA *et al.* 1997; entre outros). As RONs podem ser encontradas de forma simples e múltiplas em espécies de um mesmo gênero, como é o caso do gênero *Astyanax*; onde tem sido descrita a presença de RONs simples e múltiplas com até 15 cromossomos marcados (ROCON-STANGE, ALMEIDA-TOLEDO, 1993). As variações de sítios de RONs encontradas nessas populações, poderiam ser explicadas através de rearranjos cromossômicos, como translocações, deleções, resultando na dispersão e/ou perda de genes ribossômicos (GALETTI *et al*. 1995; CASTRO *et al*. 1996; MANTOVANI *et al.* 2000).

A ocorrência de DNA ribossômico em cromossomos sexuais tem sido observada em vários grupos de organismos. Os cístrons de genes ribossômicos 5,8S, 18S e 28S, que formam as RONs em animais, as quais são também marcadas pelo nitrato de Prata, foram observados em cromossomos sexuais de insetos, como em *Drosophila* (PELLEGRINI *et al*. 1977), (PARISE-MALTEMPI e AVANCINI, 2001), besouros (JUAN *et al*. 1993); mamíferos (YONENAGA-YASSUDA *et al*. 1983; OSHIDA *et al*. 1999) e em plantas (NAKAYAMA *et al*. 2001). Em peixes, os relatos de RONs em cromossomos sexuais se restringem a *Fundulus diaphanus* (HOWELL e BLACK, 1979), *Salvelinus alpinus* (REED e PHILLIPS, 1995), *Triportheus guentheri* (ARTONI, 1999), *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000) e *Hisonotus* sp. A (ANDREATA *et al.* 2002).

A formação de um sistema múltiplo de cromossomo sexual em peixes geralmente é decorrente de um sistema simples preexistente em um determinado grupo, como ZZ/Z0, XX/X0, ZZ/ZW, XX/XY. Nestas espécies de raias estudadas, o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ encontrado, poderia ter surgido a partir translocações recíprocas, de um ancestral com sistema simples, como por exemplo XY, se ocorrer uma quebra no cromossomo X e, ao mesmo tempo, ocorre outra quebra em um autossomo, quando um cromossomo se fragmenta ele tende imediatamente

a se fundir com outra extremidade cromossômica recém-rompida. Se um dos segmentos do X se fundir com o autossomo e a outra parte do X se unir com o outro segmento desse cromossomo autossômico, serão formados dois cromossomos X diferentes, um deles (X_1) com a maior parte do X original e o fragmento do autossomo e o outro (X_2), com o fragmento do X original e a maior parte do autossomo. Em algumas espécies de peixes, a origem do Y é claramente evidenciada, pois este possui as mesmas características dos cromossomos (X1) e (X2), como em *Hoplias malabaricus*, (BERTOLLO *et al*. 1983, 1997), em espécies de *Eigenmannia* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 1984, 2000), em *Erythrinus erythrinus* (BERTOLLO *et al*. 2004), entre outros.

VALENTIN (2001) relatou um possível sistema de cromossomo sexual do tipo XX/X0 em raias da espécie *Potamotrygon sp*. provenientes do médio rio Negro (AM), onde a fêmea apresentou 2n=68 cromossomos e o macho 2n=67 cromossomos, devido a ausência de um dos homólogos do par 2 (metacêntrico) no macho. Porém quando realizada a análise cariotípica de indivíduos da espécies *P. motoro* desta localidade (médio rio Negro), todos os exemplares de ambos os sexo apresentaram 2n=66 cromossomos, não sendo identificado nenhum heteromorfismo cromossômico. Por outro lado, a ocorrência de diferentes mecanismos de determinação sexual em grupos filogenéticamente relacionados é um fato comum em peixes Neotropicais. Esse aspecto é evidenciado em vários grupos como em Paradontidae (MOREIRA-FILHO *et al.* 1993; JESUS *et al.* 1999) em Erythrinidae (BERTOLLO *et al*. 1983; DERGAN e BERTOLLO, 1990; BORN e BERTOLLO, 2000) e em Gymnotiformes (ALMEIDA-TOLEDO *et al*. 1984, 2000, 2001), nos quais diferentes sistemas de cromossomos sexuais foram identificados entre seus representantes.

Através do presente estudo, pode ser observado que há uma grande homogeneidade em relação aos números diplóides dessas espécies. Contudo, as variações nos números de braços cromossômicos permitem sugerir que a ocorrência de extensivos rearranjos cromossômicos como inversões e/ou translocações, ocorreram durante a evolução cromossômica nas duas espécies

desse gênero, determinando variações nas fórmulas cariotípicas sem alterar os números diplóides. Se, de um lado, a homogeneidade nos números diplóides e mecanismos de heteromorfismos cromossômicos ligado ao sexo mostraram uma relação de proximidade entre o que se mostra como *P. motoro* e *P. falkneri,* pode-se supor que, a ocorrência de tal polimorfismo cromossômico pode estar refletindo não apenas a existência de duas espécies de raias de água doce neste ambiente, mas sim de um complexo de espécies, que necessita ser melhor estudado. Um entendimento consistente das relações evolutivas existentes entre os cariótipos variáveis e os mecanismos de cromossomos sexuais de *P. motoro* e *P. falkneri* dependerá de novas informações citogenéticas e moleculares de outras espécies e populações de raias de água doce.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI F. and TOLEDO-FILHO S.A. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). Genetica, v.64, p.165-169, 1984.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. and FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. Genetica, v.111, p. 1-3, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S.A. Karyotipic evolution in Neotropical freshwater fish. *I*n Chromosome Today, v.13. Switzerland: Birkhauer Verlag, p. 169-182, 2000b.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI, F., PÉQUIGNOT, E.V., DANIEL-SILVA, M.F.Z. XX:XY sex chromosome system with X heterocromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens.* Citogenet. Cell Genet., v. 95, p. 73-78, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. and FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. Genetica, v.111, p. 1-3, 2001.

ANDREATA, A.A. Estudos citogenéticos no gênero Microlepidogaster (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, 196p, 2002.

ARTONI, R.F., BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Genetica, v.106, p. 209-214, 1999.

ARTONI, R.F., BERTOLLO, L.A.C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genis Triportheus. A monophyletic state and NOR location on the chromosome. Heredity, v.89, p. 15-19, 2002.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética *1*: 103-120, 1978.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). Cytologia, v.48, p. 1-12, 1983.

BERTOLLO, L.A.C., FONTES, M.S., FENOCCHIO, A.S., CANO, J. The X1X2Y sex chromosome system in the *Hoplias malabaricus*. I. G-, C and chromosome replication banding. Chromosome Res 5: 493-499, 1997.

BERTOLLO, L.A.C. & MESTRINER, C.A. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. Chromosome Res 6: 141–147, 1998.

BERTOLLO LAC, OLIVEIRA, C., MOLINA, W.F.; MARGARIDO, V.P.; FONTES, M.S. PASTORI, M.C.; FALCÃO,J.N. AND FENOCCHIO, A.S. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). Heredity, 93, 228-233, 2004.

BORN, G.G. and BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. Chromosome Res., v.8, p. 111-118, 2000.

CASTRO, J.; VIÑA, A.; SÁNCHES, L.; MARTINEZ, P. Caracterization of na atypical NOR site polymorfism in Brown trout (Salmo trutta) with Ag and CMA3-staining, and fluorescent in situ hybridization. Cytogenet. Call Genet, v.75, p.234-239, 1996.

CESTARI, M. M.; GALLETTI Jr., P. M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguai rivers: evolution and cytotaxonomic considerations. Copeia. (1): 108-112. 1992a

DERGAN, J. & BERTOLLO, L.A.C. Karyotypic diversification in Hoplias malabaricus (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná Basins, Brazil. Brazilian Journal of Genetics, 13: 755-756. 1990.

DONAHUE, W.H. A karyotypic study of three species of Rajiformes (Chondrichthyes, Pisces). Can. J. Genet. Cytol. 16: 203-211. 1974.

FORESTI F, TOLEDO FS, ALMEIDA-TOLEDO LF. Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenet Cell Genet 31: 134-141, 1981.

GALETTI Jr, P.M., LIMA, N. R. W. and VENERE, P.C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). Cytologia, v.60, p. 375-382, 1995.

GALETTI JR., P.M., SILVA, E.B., CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev Brasil Genet 8*: 479-484. 1985.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. Copeia, v.3, p. 544-546, 1979.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015. 1980.

JESUS C.M., BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. Genetica, v.105, p. 63-67, 1999.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Chromosome Res., v.1, p.167-174, 1993.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBREG, A.A. Nomeclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v.52, p.201-220. 1964.

MAKINO, S.The chromosomes of two elasmobranch fishes. Cytologia 2: 867-876. 1937.

MANTOVANI, M., ABEL, L.D.S., MESTRINER, C.A., MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. Genetica, v.109, p. 161-168, 2000.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI JR.; P.M. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in Paradon hilarii (Paradontidae). Caryologia, v.46, p.115-125, 1993.

MORESCALCHI, A. Chromosomes, sex determination and environment in teleostens. In: Dallai R. (Ed.) Sex Origin and Evolution. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., Modena: Mucchi, p. 137-149, 1992.

NAKAYAMA, C. M. Caracterização Cariotípica de Peixes da Subfamília Serralminae (Characiformes) da Bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado. Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Programa de Pós-graduação em Biologia tropical e Recursos Naturais. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Manaus, Am. 60p. 1997.

NAKAYAMA, S., FUJISHITA, M., SONE, T., OHYAMA, K. Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. Chromosome Research, v.9, p. 469-473, 2001.

OSHIDA, T., SHINDO, J., YOSHIDA, M.C. NOR-bearing Y chromosome in american beaver, *Castor canadensis* (Rodentia, Castoridae). Chromosome Science, v.3, p.117-118, 1999.

PASONATO, J.C. Estudos citogenéticos em espécies de *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) e ocorrência de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. Dissertação de mestrado. UNESP – Botucatu, 2006.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; AVANCINI, R.M.P. C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies Chrysomya megacephala and Chrysomya putoria (Diptera, Calliphoridae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, .96, p.371-377, 2001.

PELLEGRINI, M.; MANNING, J.; DAVIDSON, N. Sequence arrangement of the rDNA of Drosophila melanogaster. Cell, v.10, p.213-214, 1977.

REED, K. M. AND PHILLIPS, R. B. Molecular cytogenetic analysis of the double-CMA_3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenet Cell Genet*, 70**:** 104–107, 1995.

ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; FIORILLO, M.; TINTI, F. & STINGO, V. Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, Taenura lymma and Raja montagui (Chondrichthyes, Batoidea). Genetica 123: 245–253, 2004.

ROCON-STANGE, E.A. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restrited to males in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae). Rev. Brasil. Genet. 16 (3): 601-615, 1993.

SCHART, M.; NADA, I.; SCHLUPP, I.; WILDE, B.; EPPLEN, J.T.; SCHI IDT, M.; PARZEFALL, J. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. Nature v.373, p. 68-71, 1995.

STINGO, V. & ROCCO, L. Selachian cytogenetics: a review. Genetica 111: p. 329-347, 2001.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: p. 304-306, 1972.

VALENTIM, F.C.S. Caracterização cromossômica em espécies de peixes da família Potamotrygonidae (CHONDRICHTHYES, RAJIFORMES) do médio rio Negro. Dissertação de mestrado, UFSCAR, 2001.

VALENTIM, F.C.S.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. Chromosomes of three freshwater stingrays (Rajiformes, Potamotrygonidae) from the Rio negro basin, Amazon, Brazil. Genetica, 128: p.33–39, 2006.

WASKO, A.P. & GALETTI, JR.,P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish Bryconamericus (Characidae). Cytologia 64:63-67, 1998.

WASKO, A.P. Estudos citogenéticos no gênero Bryconamericus (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonômica evolutiva. Masters Thesis. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil, 1996.

YONENAGA-YASSUDA, Y., ASSIS, M.F.L., KASAHARA, S., L'ABBATE, M.L., SOUZA, M.J. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. Cytogenet. Cell Genet., v.35, p. 143-147, 1983.

Tabela 4 – Dados citogenéticos e fórmulas cariotípicas dos exemplares analisados nas populações das espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri.*

Espécie	**Localidade**	**ND**	**NF**	**Fórmula cariotípica**	**Ag-RONs**	**Bandamento C**	**Figuras**
P. motoro	Porto Rico – PR	♀66	116	22m+8sm+20st+16a	7	Centromérica	Figura 7
		♂65	114	21m+9sm+19st+16a	7	Centromérica	Figura 8
P. motoro	Ilha Solteira – SP	♀66	122	20m+10sm+26st+10a	6	Centromérica	Figura 9
		♂65	120	19m+11sm+25st+10a	6	Centromérica	Figura 10
P. falkneri	Porto Rico – PR	♀66	110	20m+10sm+14st+22a	6	Centromérica	Figura 11
		♂65	108	19m+10sm+14st+22a	6	Centromérica	Figura 12

P. falkneri	Ilha Solteira – SP	♀66	114	20m+10sm+18st+18a	7	Centromérica	Figura 13
		♂65	112	19m+10sm+18st+18a	7	Centromérica	Figura 14

(ND= número diplóide, NF= número fundamental)

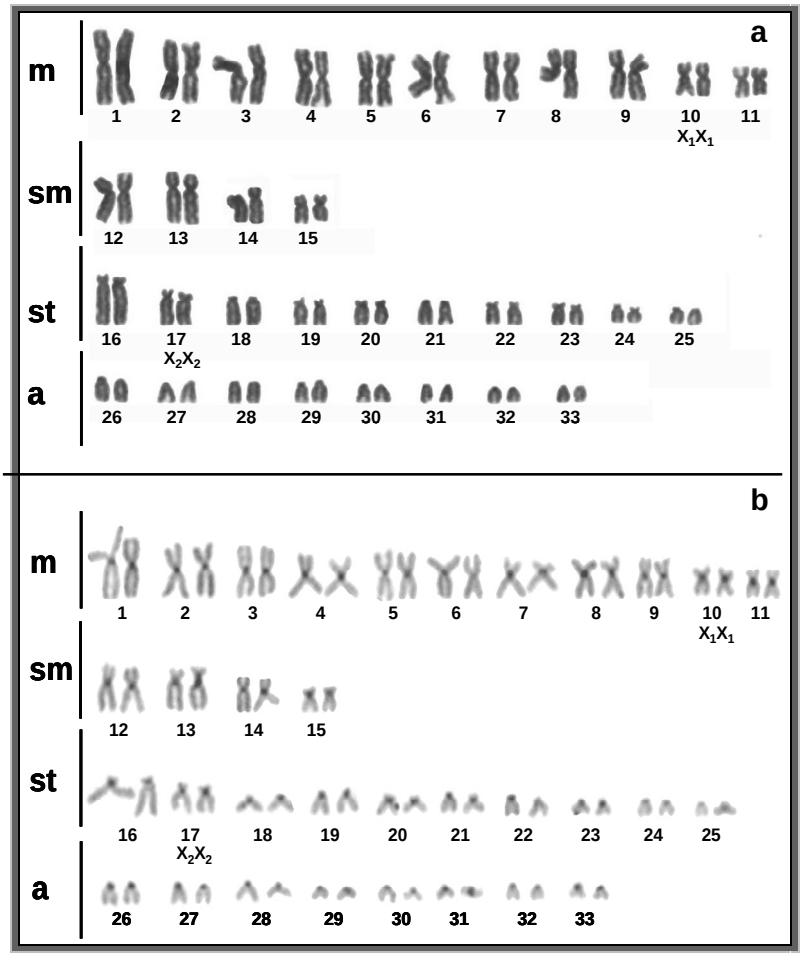


Figura 7 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

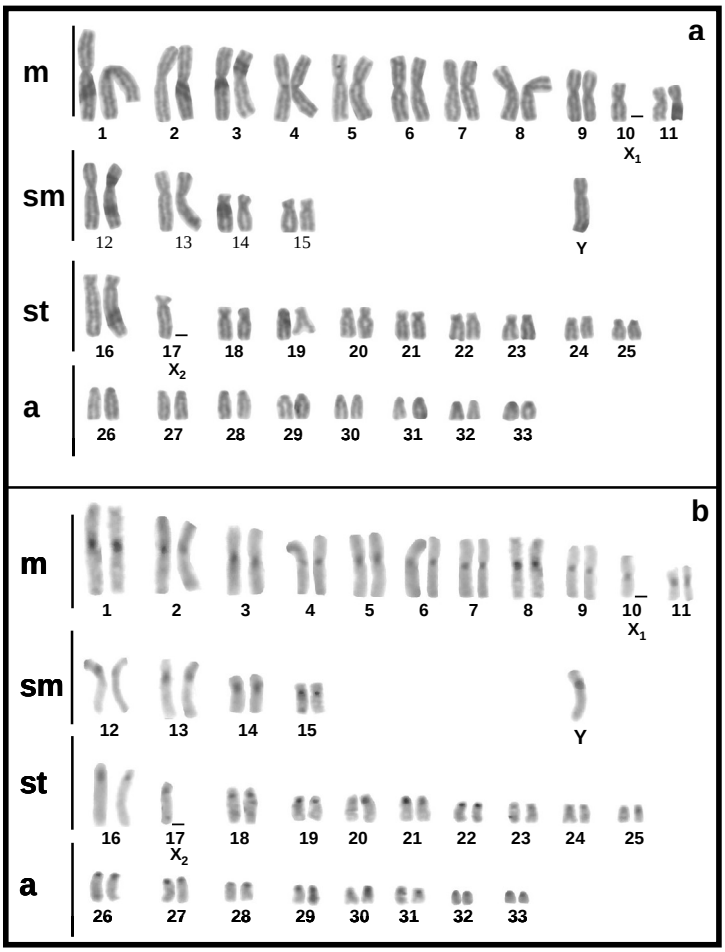


Figura 8 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

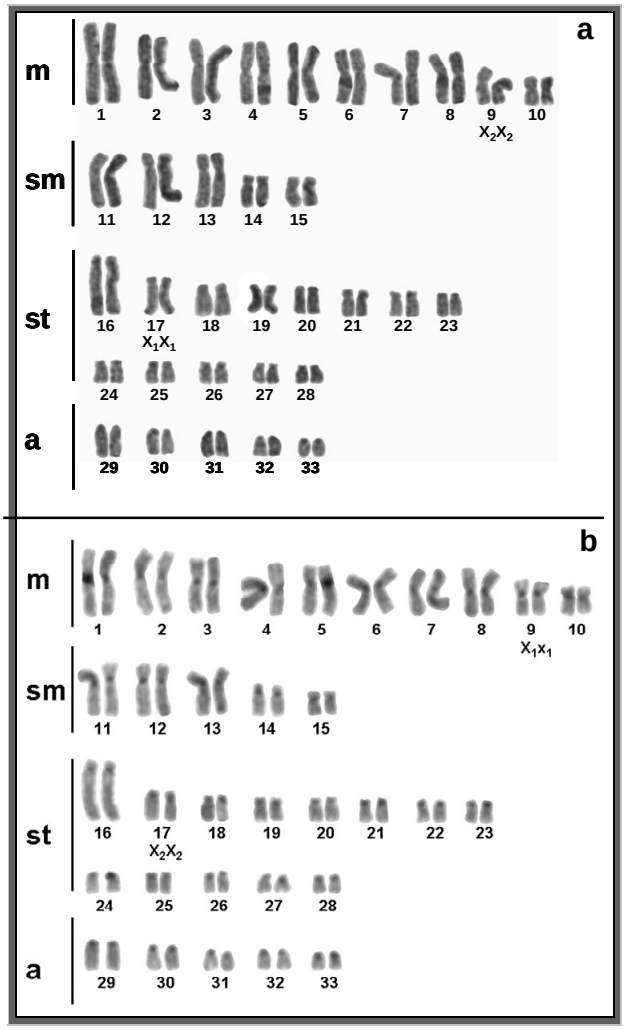


Figura 9 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

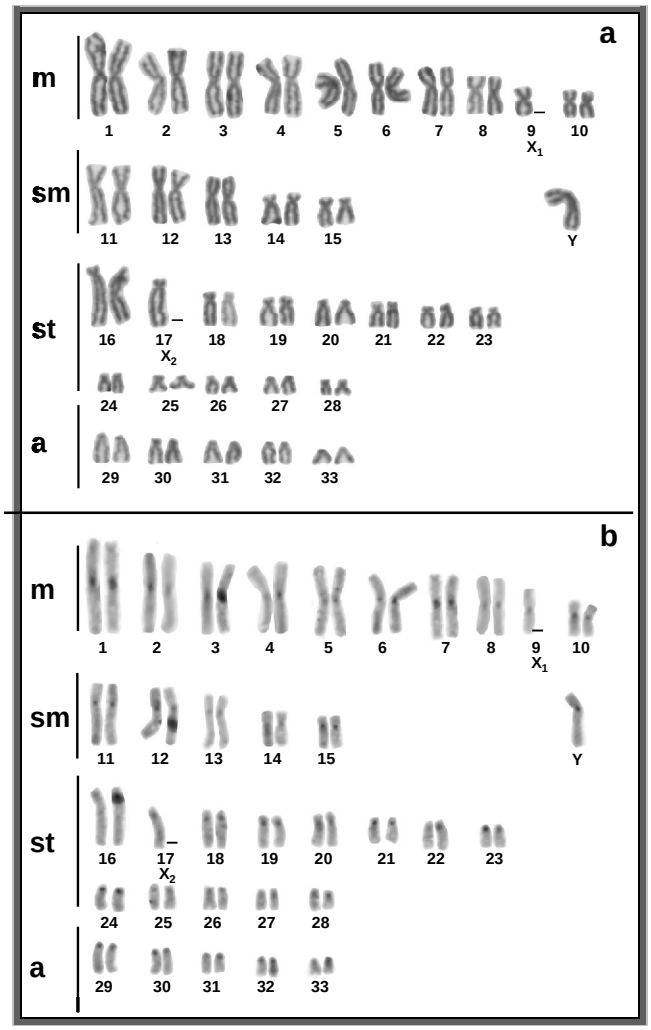


Figura 10 – Cariótipos de *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

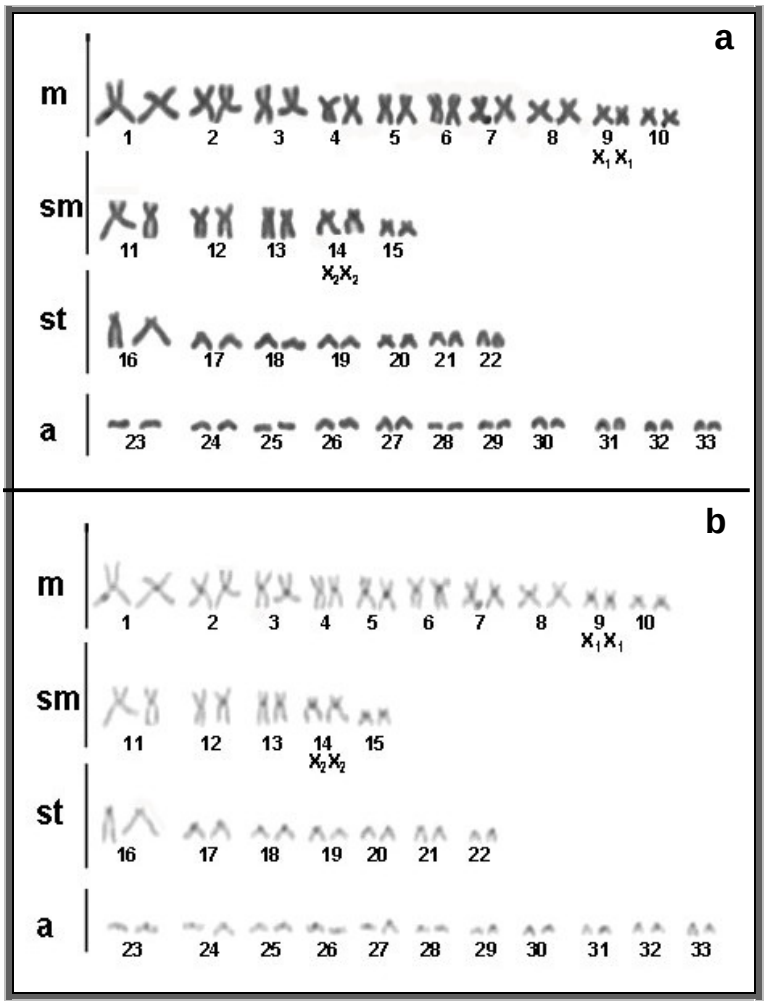


Figura 11 – Cariótipo de *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giensa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

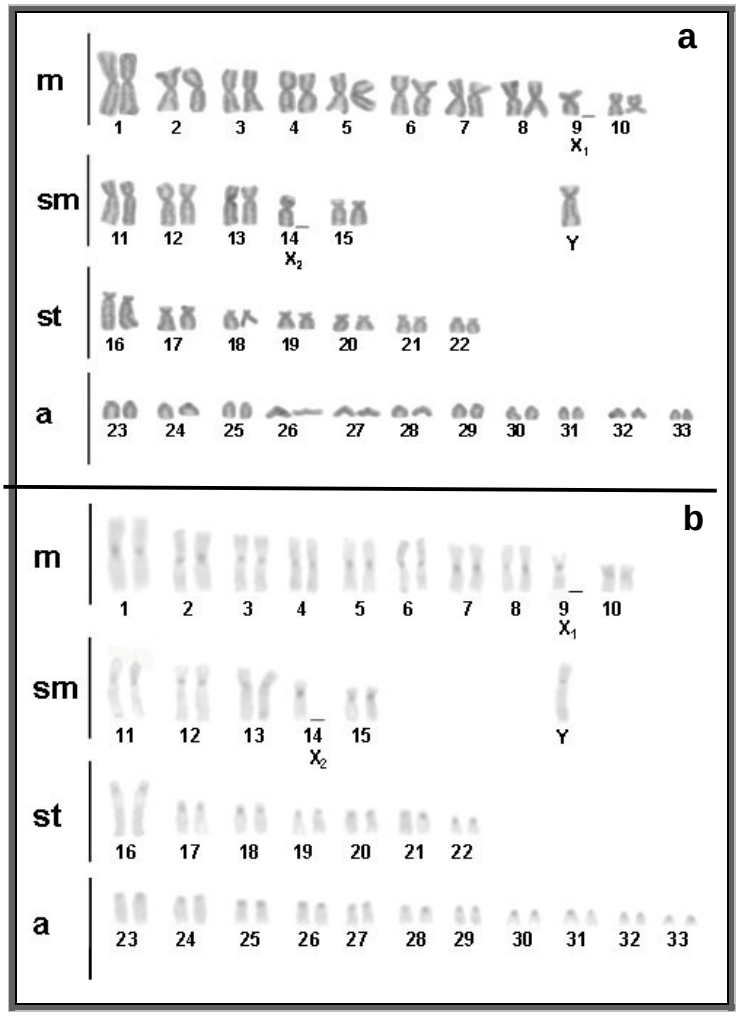


Figura 12 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (macho) da população de Porto Rico, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giensa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

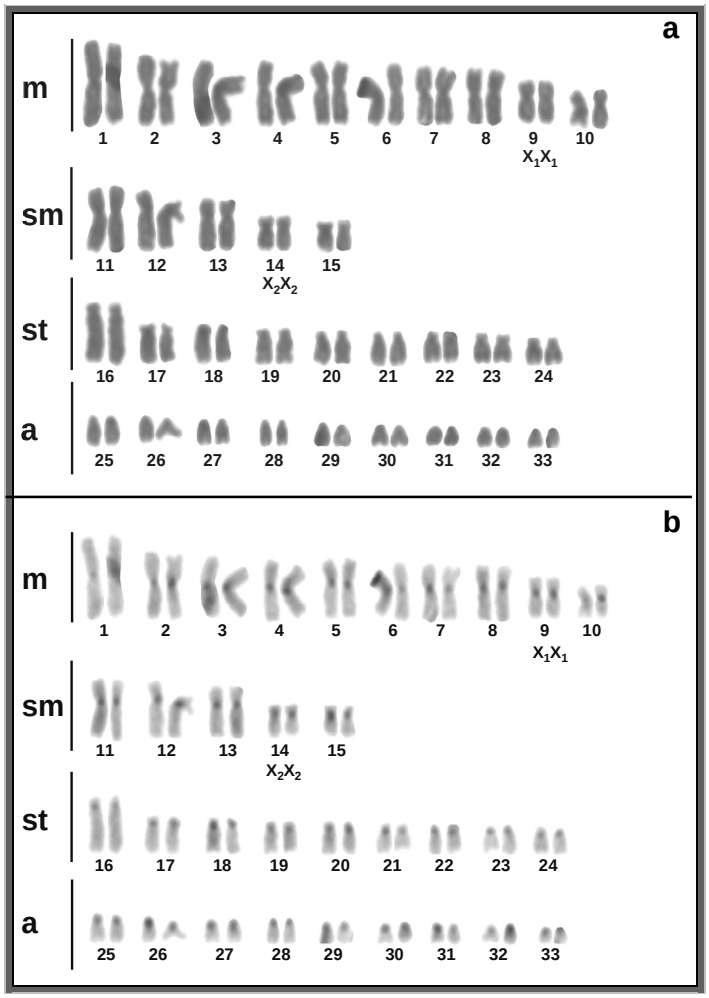


Figura 13 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

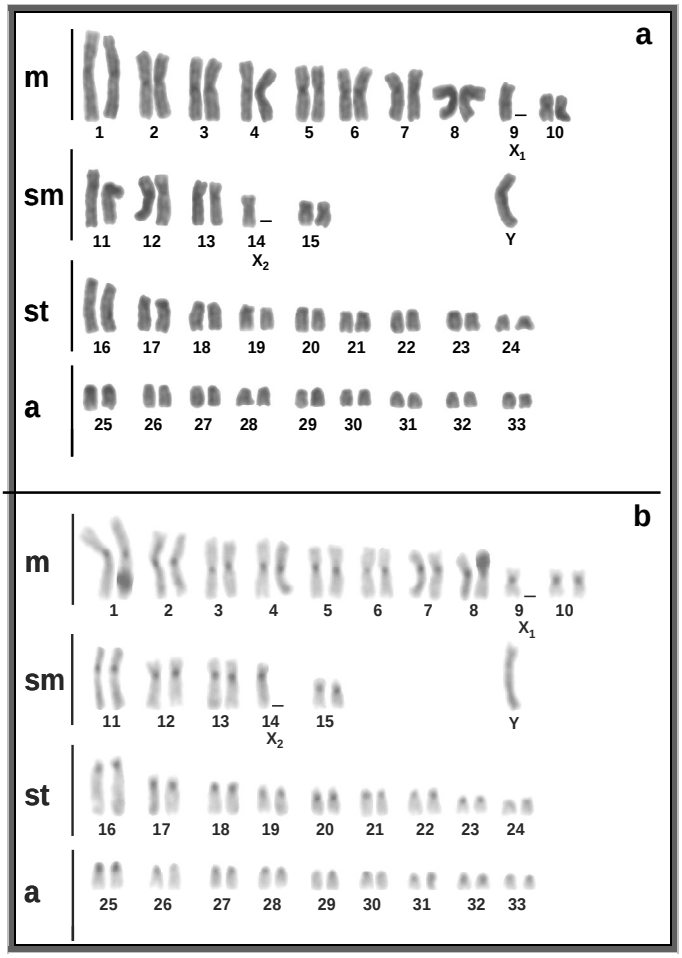


Figura 14 – Cariótipos de *Potamotrygon falkneri* (Macho) da população de Ilha Solteira, evidenciando os cromossomos sexuais, (a) com coloração convencional por Giemsa, (b) e análise da heterocromatina constitutiva, após realização da técnica de bandamento C.

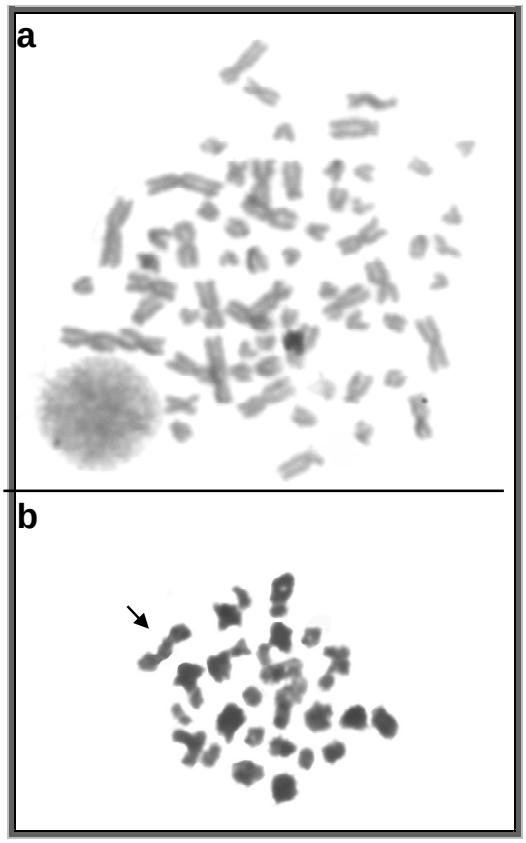


Figura 15 – Cromossomos meióticos de *Potamotrygon falkneri* , população de Ilha Solteira, (a) metáfase espermatogonial (2n=65 cromossomos) após coloração com Giemsa e metáfase I (b), com 30 bivalentes e um trivalente (indicado pela seta).

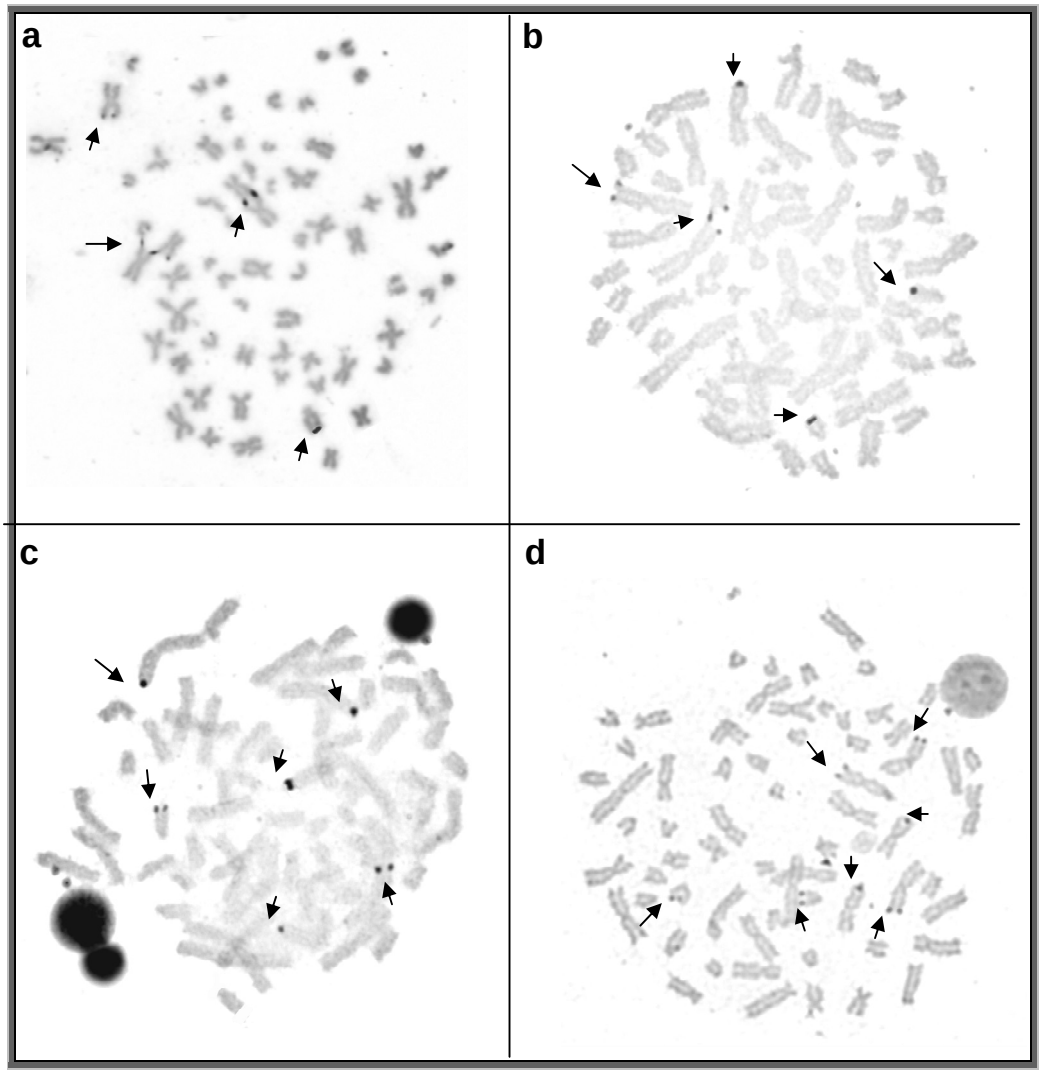


Figura 16 – Metáfases somáticas, após tratamento com coloração por nitrato de Prata, as setas indicam os sítios Ag-RONs ativos. (a) *P. motoro* - população de Porto Rico e Ilha solteira (b), *P. falkneri* população de Porto Rico (c) e Ilha Solteira (d).

CAPÍTULO 2

MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES RIBOSSOMAIS 5S E 18S EM *Potamotrygon motoro* E *Potamotrygon falkneri* (CHONDRICHTYES: POTAMOTRYGONIDAE).

RESUMO

O acesso a hibridação "*in situ*" nos cromossomos com as duas classes distintas de genes que codificam o RNA ribossômico, nos eucariontes identificadas como Classe maior do DNA ribossomal 45S e a Classe menor de DNAr 5S apresenta estes segmentos como marcadores interessantes para o estudo das relações entre espécies próximas de peixes. No presente estudo, foi realizada a identificação da localização cromossômicas dos genes ribossomais 5S e 18S em representantes de duas populações de *Potamotrygon motoro* e duas populações de *P. falkneri*, de ocorrência na bacia hidrográfica do Alto Paraná, nas regiões de Porto Rico (PR) e Ilha Solteira (SP). Os exemplares coletados foram submetidos à técnica de obtenção de cromossomos mitóticos, coloração convencional com Giemsa, Banda C, Ag-RON, CMA_3, FISH. As duas espécies em estudo, apresentaram número diplóide de 2n=66 cromossomos nas fêmeas e 2n=65 cromossomos nos machos. A heterocromatina constitutiva (Banda C) foi identificada nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos do complemento e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram caracterizadas como RONs múltiplas e localizadas nas regiões terminais dos cromossomos nas duas espécies. O emprego do fluorocromo CMA_3 evidenciou, além das Ag-RONs, marcações adicionais nas duas espécies em estudo. Os cístrons ribossômicos através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 18S, foram coincidentes com as mesmas marcações evidenciadas pela impregnação da Prata nas duas espécies, e um sítio adicional foi encontrado em *P. falkneri,* nos indivíduos da população de Porto Rico. A sonda de DNAr 5S revelou marcações em quatro sítios nas regiões terminais dos cromossomos, em sintenia com os sítios de DNAr 18S, nas duas populações de *P. motoro*. Em *P. falkneri* foram encontrados sítios de DNAr 5S nas regiões terminais de três cromossomos, sendo apenas um deles coincidente com os sítios de DNAr 18S. Os dados obtidos, além de revelarem aspectos citogenéticos destas espécies, podem também ser utilizados em interpretações evolutivas, na inferência da estrutura genética das espécies e/ou populações de *P. motoro* e *P. falkneri*,

fornecendo subsídios a futuros estudos que visem à compreensão das relações entre as espécies deste grupo.

PALAVRAS-CHAVE: Peixes cartilaginosos, banda RON, banda C, cromomicina A_3, genes ribossômicos.

INTRODUÇÃO

Os estudos citogenéticos têm evidenciado a ocorrência de uma grande variabilidade cariotípica nos peixes, tanto em relação ao número de cromossomos quanto à morfologia. Segundo ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2000b), dentre cerca de 706 espécies de peixes neotropicais já estudadas citogenéticamente, o número cromossômico pode variar de 2n=20 à 2n=134, podendo ser identificados grupos de espécies bastante conservados em relação ao número e à morfologia dos cromossomos e grupos bastante variáveis.

Os Elasmobrânquios constituem provavelmente a classe de vertebrados menos estudada no ponto de vista da evolução sistemática (ROCCO *et al*. 2004). Apesar dos estudos de cariótipos de peixes terem aumentado consideravelmente nos últimos tempos, os Chondrichthyes permanecem entre os menos estudados, havendo poucos dados citogenéticos em peixes cartilaginosos, se considerarmos o fato de ser conhecida a morfologia cariotípica de apenas 6% das cerca de 1.100 espécies deste grupo viventes atualmente (STINGO & ROCCO, 2001).

Os dados citogenéticos sobre raias marinhas indicam a existência de uma variação no número diplóide de 2n=28 em *Narcine brasilians* (DONAHUE, 1974) à 2n=104 em *Raja meerdervoortei* (MAKINO, 1937). Entre as raias de água doce da família Potamotrygonidae os dados citogenéticos indicam que as espécies *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi* possuem o mesmo número diplóide de 2n=66 cromossomos, enquanto a espécie *Paratrygon aiereba* apresenta 2n=90 cromossomos (VALENTIN *et al.* 2006).

Um dos mais efetivos métodos de estudo citogenético de peixes cartilaginosos tem sido a combinação de técnicas clássicas de bandamento cromossômico, técnicas citogenéticas moleculares e hibridação *in situ* fluorescente (ROCCO *et al*. 2006). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo, identificar a distribuição cromossômica dos genes ribossômicos 5S e 18S nas espécies de raias *Potamtrygon motoro* e *P. falkneri*, e estabelecer as particularidades estruturais e moleculares dos cromossomos com a aplicação de metodologias citogenéticas específicas (Giemsa, Banda C, Ag-RONs, CMA_3, FISH).

Material e métodos

Foram analisadas 30 exemplares de *Potamotrygon motoro* e 34 exemplares de *P. falkneri* provenientes da bacia hidrográfica do alto Paraná, nas regiões de Porto Rico – PR e Ilha Solteira – SP, coletados entre os anos de 2006 à 2008.

Cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica descrita por FORESTI *et al.* (1981), com algumas adaptações para raias de água doce. A montagem do cariótipo foi realizada de acordo com LEVAN *et al*. (1964). Regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram identificadas no complemento cromossômico utilizando a técnica de coloração por nitrato de Prata, desenvolvida por HOWELL & BLACK (1980) e os padrões de heterocromatina constitutiva nas preparações cromossômicas foram obtidos segundo o método proposto por SUMNER (1972). A detecção de regiões ricas em pares de bases G-C foram identificadas através da técnica descrita por SCHWEIZER (1976), utilizando o fluorocromo CMA_3.

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com procedimentos descritos por PINKEL *et al.* (1986), com modificações, utilizando sondas de DNAr 5S obtidas de uma sequência do DNA 5S da espécie *Leporinus elongatus* (MARTINS & GALETTI JR, 1999) e a sonda DNAr 18S foi obtida de uma

sequência do DNAr 18S da espécie *Prochilodus argenteus* (HATANAKA & GALETTI JR, 2005). As sondas foram marcadas pelo método de nick translation utilizando o Kit BioNick ^{TM} Labeling System (Invitrogen).

A hibridação *"in situ"* foi realizada utilizando os fluorocromos avidina-fluoresceína. As sondas 18S e 5S foram desnaturadas em formamida a 62%: 2XSSC por 5 minutos. O DNA foi hibridado a 37°C *overnight* em uma câmara úmida. A sonda foi detectada pela anti-avidina. Posteriormente as lâminas foram coradas com DAPI e fotografadas com fotomicroscópio Olympus, modelo BX50 equipado com Epi-Fluorescência.

Resultados

As espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* apresentaram 2n=66 cromossomos nas fêmeas e 2n=65 cromossomos nos machos, identificando a ocorrência de heteromorfismo cromossômico que caracteriza o sistema de cromossomo sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (como descrito no Capítulo 1).

Diferenças no número fundamental foram encontradas entre as populações e espécies analisadas (como descrito no Capítulo 1), o padrão de bandamento C, mostrou que as espécies *P. motoro* (Figura 17) e *P. falkneri* (Figura 18) apresentam grandes segmentos banda C positivos localizados em posição centromérica na maioria dos cromossomos do complemento (assim como já descrito no Capítulo 1).

A coloração dos cromossomos com o fluorocromo CMA_3, nas duas espécies evidenciou marcações consistentes e coincidentes com as reveladas pelo emprego da técnica de Ag-RONs (Figuras 19 e 20). Além das Ag-RONs, outros segmentos CMA_3 positivos foram encontrados.

A hibridação *in situ* nas espécies *P. motoro* (Figura 21) e *P. falkneri* (Figura 22), confirmou a presença de DNAr 18S coincidente com as Ag-RONs. Contudo, a espécie *P. falkneri* apresentou marcações em mais 1 cromossomo acrocêntrico na população de Porto Rico.

Os sítios de DNAr 5S em *P. motoro*, população de Porto Rico foram localizados nas regiões terminais dos cromossomos dos braços curtos do par 02 e nos braços longos do par 06, em sintenia com a região de DNAr 18S (Figuras 21a, 21b, 21c), o mesmo encontrado na população de Ilha Solteira (Figuras 21d, 21e, 21f). Em *P. falkneri* os sítios de DNAr 5S foram encontrados nas regiões terminais dos braços longos do par 04, também associados às regiões de DNAr 18S, além de marcação no braço curto em um dos homólogos do par 12 (Figuras 22a, 22b, 22c), os mesmos cromossomos também foram identificados na população de Ilha Solteira (Figuras 22d, 22e, 22f).

DISCUSSÃO

Os estudos recentes dos genes ribossomais em espécies de raias marinhas tem sido desenvolvidos com a associação de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, principalmente com o uso da técnica de hibridação "*in situ*" flurescente (FISH). Em contra partida, em espécies de raias de água doce, os trabalhos realizados se restringem basicamente à aplicação de técnicas de citogenética clássicas, de modo geral envolvendo genes ribossomais na região nucleolar.

Neste estudo, como já evidenciado no Capítulo 1, as duas espécies de raias do gênero *Potamotrygon* estudadas apresentaram o mesmo número diplóide, porém com diferenças em suas fórmulas cariotípicas, apresentando a mesma distribuição de segmentos banda C positivos nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos.

Uma limitação apresentada pelo uso desta técnica de RON refere-se ao fato de que a Prata não se liga às regiões de DNAr, mas sim às proteínas associadas à estrutura nucleolar, limitando-se a identificar somente as RONs que estiverem ativas na interfase procedente (MILLER *et al*. 1976). Entretanto, estas RONs também podem ser evidenciadas, independentemente de sua atividade

transcricional com o uso de corantes GC-específicos como a cromomicina (CMA_3) e a mitramicina (MM) (HOWELL, 1982; SCHIMID *et al*. 1982; ROCCHI, 1982; SATYA-PRAKASH & PATHAK, 1984; entre outros). Em *P. motoro* e *P. falkneri,* a coloração com o fluorocromo CMA_3 também identificou segmentos marcados nos mesmos cromossomos envolvidos com as RONs. Esta correspondência entre as regiões de RONs positivas e CMA3 positivas indica uma composição rica em bases GC na região das RONs, provavelmente presentes nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre sequências de DNA repetitivos adjacente (SCHIMID, 1980). Contudo, este tipo de abordagem deve ser feito com certas ressalvas, visto que podem ocorrer regiões cromossômicas igualmente ricas em GC, sem correspondência com as RONs (ARTONI *et al*. 1999), como também observado neste estudo.

Para a caracterização efetiva das regiões organizadoras de nucléolo em *P. motoro* e *P. falkneri*, foi realizada a técnica de hibridação "*in situ"* utilizando sondas os genes ribossomais DNAr 5S e 18S. A hibridação "*in situ"* do gene ribossomal 18S em *P. motoro* evidenciou as mesmas regiões encontradas pela impregnação por nitrato de Prata nas duas populações analisadas.

O mesmo também ocorreu em *P. falkneri* nos exemplares da população de Porto Rico que, após as análises por hibridação *in situ* mostraram também a presença de um lócus de DNAr 18S em adição aos seis cromossomos coincidentes detectados pelo nitrato de Prata. Tal região específica também foi identificada pela $CMA_{3.}$ Na população de Ilha Solteira, as regiões encontradas pela Prata foram coincidentes com as evidenciadas pela sonda DNAr 18S e o fluorocromo CMA_3, sendo que este último marcador também evidenciou sítios adicionais. É relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios identificados pela hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S, que os identificados pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, como já observado em *Hoplias malabaricus* (BORN & BERTOLLO, 2000) *Astyanax scabripinnis* (FERRO *et al.* 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *Prochilodus lineatus* (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2003),

entre outros. Isto se deve ao fato de que tais segmentos podem estar presentes no genoma mas não se encontrarem ativos, produzindo os RNAs correspondentes.

A localização cromossômica do gene DNAr 5S tem sido descrita em vários grupos de peixes, como em Rajidiformes, Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes, and Tetraodontiformes e tem se mostrado de grande importância para a compreensão da estrutura e organização desses cromossomos (MARTINS & WASKO, 2004).

Muitas espécies de peixes apresentam um número máximo de quatro sítios de DNAr 5S localizados preferencialmente em regiões intersticiais, próximas ao centrômero dos cromossomos, o que poderia ser interpretado como uma estratégica para a preservação do gene, uma vez que este estaria menos sujeito a rearranjos cromossômicos (MARTINS & GALETTI, 2001). No presente estudo, as duas espécies de raias analisadas apresentaram uma variação de 3 a 4 cromossomos apresentando sítios de DNAr 5S, sendo quatro *loci* de DNAr 5S encontrados nas duas populações de *P. motoro* e três *loci* nas duas populações de *P. falkneri* estudadas. O aumento dos sítios DNAr 5S poderia estar relacionado com um processo de dispersão dessas sequências gênicas, levando a um aumento da variabilidade genética para estas espécies.

A hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 5S e 18S simultaneamente permitiu uma melhor análise da distribuição desses genes nos cromossomos. Os genes ribossomais 18S foram observados em uma condição de sintenia com o 5S em ambas as espécies estudadas, e pelo menos um par cromossômico. Em *P. motoro* o gene ribossomal 5S localizou-se terminalmente no braço longo do par dois e do par seis adjacente à localização do gene 18S nas duas populações analisadas. Em *P. falkneri*, as duas populações apresentaram a localização do DNAr 5S terminalmente no braço longo do segundo par de um cromossomo metacêntrico adjacente à localização do gene 18S, e além desse par, o DNAr 5S foi evidenciado no braço curto em um dos homólogos do par doze.

A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação menos frequente entre os vertebrados. Mas entre os peixes tal

relacionamento cromossômico dos segmentos de DNAr 5S e 18S aparecem com frequência, como observado em *Salmo solar* (PENDÁS *et al.* 1994), *Oncorhynchus mykiss* (MÓRAN *et al.* 1996), em espécies do gênero *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002). Em peixes cartilaginosos, a espécie de raia de água salgada *Taeniura lymma* também apresentou um dos dois sítios de DNAr 5S co-localizado com os sítios de DNAr 18S. MARTINS e GALETTI (2001) sugerem que este tipo de modelo não é acidental e poderia fornecer alguma vantagem para a organização destes genes no genoma de vertebrados.

Por outro lado, em várias espécies de peixes, este *locus* tem sido mapeado em distintos cromossomos (MARTINEZ *et al.* 1996; MÓRAN *et al.* 1996; MARTINS & GALETTI, 2001; BORN & BERTOLLO, 2000; FERRO *et al.* 2001; VICENTE *et al.* 2001; WASKO *et al.* 2001, entre outros) representando a condição mais freqüente descrita para vertebrados (DROUIN & MUNIZ DE SÁ, 1995; SUZUKI *et al.* 1996, entre outros) e, aparentemente, representando um padrão ancestral.

Os dados citogenéticos moleculares obtidos neste estudo, visando uma melhor compreensão sobre a distribuição dos genes ribossômicos nas duas espécies de raias analisadas, representa um contribuição também para a compreensão do processo de evolução cromossômica nesse gênero de raias de água doce.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Renato Devidé pela assistência técnica, ao apoio financeiro concedido pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S.A. Karyotipic evolution in Neotropical freshwater fish. *I*n Chromosome Today, v.13. Switzerland: Birkhauer Verlag, p. 169-182. 2000b.

ALMEIDA TOLEDO, L.F.;OZOUF-COSTZ.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenet Genome Res., v.97, p.229-233, 2002.

ARTONI, R.F., BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Genetica, v.106, p. 209-214, 1999.

BORN, .G.; BERTOLLO, L. A.C. An XX/XY Sex chromosome system in a fish species, Hoplias malabaricus with apolymorphic NOR bearing X chromosome. Chromosome Research, v.8, p.111-118, 2000.

DONAHUE, W.H. A karyotypic study of three species of Rajiformes (Chondrichthyes, Pisces). Can. J. Genet. Cytol. 16: 203-211, 1974.

DROUIN, G. & MUNIZ DE SÁ, M.The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. Mol. Biol. Evol., v.12, p.481-493, 1995.

FERRO, D.A.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. Genetica, v.110, p.55-62, 2001.

FORESTI F, TOLEDO FS, ALMEIDA-TOLEDO LF. Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenet Cell Genet 31: 134-141, 1981.

HATANAKA & GALETTI JR. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica. 239-244, 2005.

HOWELL, W,M, & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015, 1980.

HOWELL, W.M. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs) In: The call nucleus. New York-London, Bush H., Roth Blum, I. eds., Vol. XI. Academic Press p.89-142, 1982.

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localiztion of 5S and 18S rRNA genes in Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae). Caryologia, v.56, p.281-287, 2003.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBREG, A.A. Nomeclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v.52, p.201-220, 1964.

KAVALCO, K.F. e MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus Astyanax (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. Caryologia, v.56, n.4, p.453-461, 2003.

MAKINO, S. The chromosomes of two elasmobranch fishes. Cytologia 2: 867-876, 1937.

MARTINEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (Anguilla anguilla). Cytogen Cell Genet., v.73; p.149-152, 1996.

MARTINS, C. & GALETTI, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Chraciformes). Chromosome Research 7: 363-367, 1999.

MARTINS, C. & GALETTI, P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome 44*: 903-910, 2001.

MARTINS, C. & WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. Focus on Genome Research p.335-363, 2004.

MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVASHI, R.; MILLER, O.J. Supression of buman nucleolus organizer activiy in mouse-buman somatic hybrid cells. Expl. Cell Res, v. 101, p.235-243, 1976.

MORÁN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics 75*: 145-150, 1996.

PENDÁS, A.M., MORÁN, P., FREIJE, J.P., GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics 67*: 31-36, 1994.

PINKEL, D.; STRAUME, T. e GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934-2938, 1986.

ROCCHI, A. On the heterogeneity of heterochromatin. Caryologia, 35 (2): 169-189, 1982.

ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; FIORILLO, M.; TINTI, F. & STINGO, V. Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, Taenura lymma and Raja montagui (Chondrichthyes, Batoidea). Genetica 123: 245–253, 2004.

ROCCO, L.; PIZANO, E.; OZOUF COSTAZ, C.; FOSRETI, F. & KAPOOR, B. Fish Cytogenetycs. Editora Science Publishers, England, 2006.

SATYA-PRAKASH, K.L. & PATHAK, S. Silver staining pattern of male meiosis in the house cricket. J. Hered., 75:319-320, 1984.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiates ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). Chromosoma, v.80, p. 69-96, 1980.

SCHMID, M. Chromosome bandingin Amphibia. VII. Analysis of the tructure and variability of NORs in Anura. Chromosoma, 87: 327-344, 1982.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma, Berlim, v.58, p.307-324, 1976.

STINGO, V. & ROCCO, L. Selachian cytogenetics: a review. Genetica 111: p. 329-347, 2001.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: p. 304-306, 1972.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. Cytogenet. Cell Genet, v. 72, p.1-4, 1996.

VALENTIM, F.C.S.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. Chromosomes of three freshwater stingrays (Rajiformes, Potamotrygonidae) from the Rio negro basin, Amazon, Brazil. Genetica, 128: p.33–39, 2006.

VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Paradon* species (Pisces, Parodontidae). Caryologia, v.4, p.365-369, 2001.

WASKO A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALETTI, JR.,P.M. Molecular organization of 5S rRNA in fishes of the genus Brycon. Genome, v.44, p.839-902, 2001.

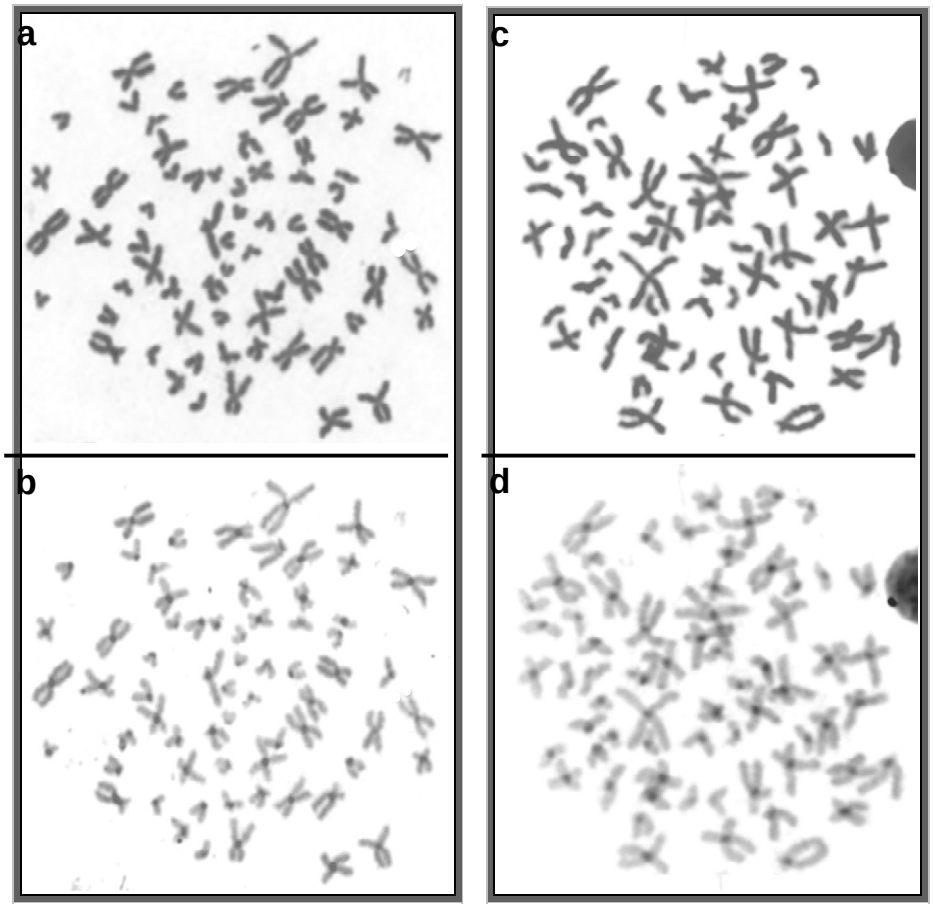


Figura 17 – Metáfases somáticas de *Potamotrygon motoro* (fêmea), da população de Porto Rico, (a) após coloração convencional com Giemsa, análise sequencial da heterocromatina constitutiva (b), *Potamotrygon motoro* (macho) da população de Ilha Solteira após coloração convencional com Giemsa (c), e identificação da heterocromatina constitutiva (d).

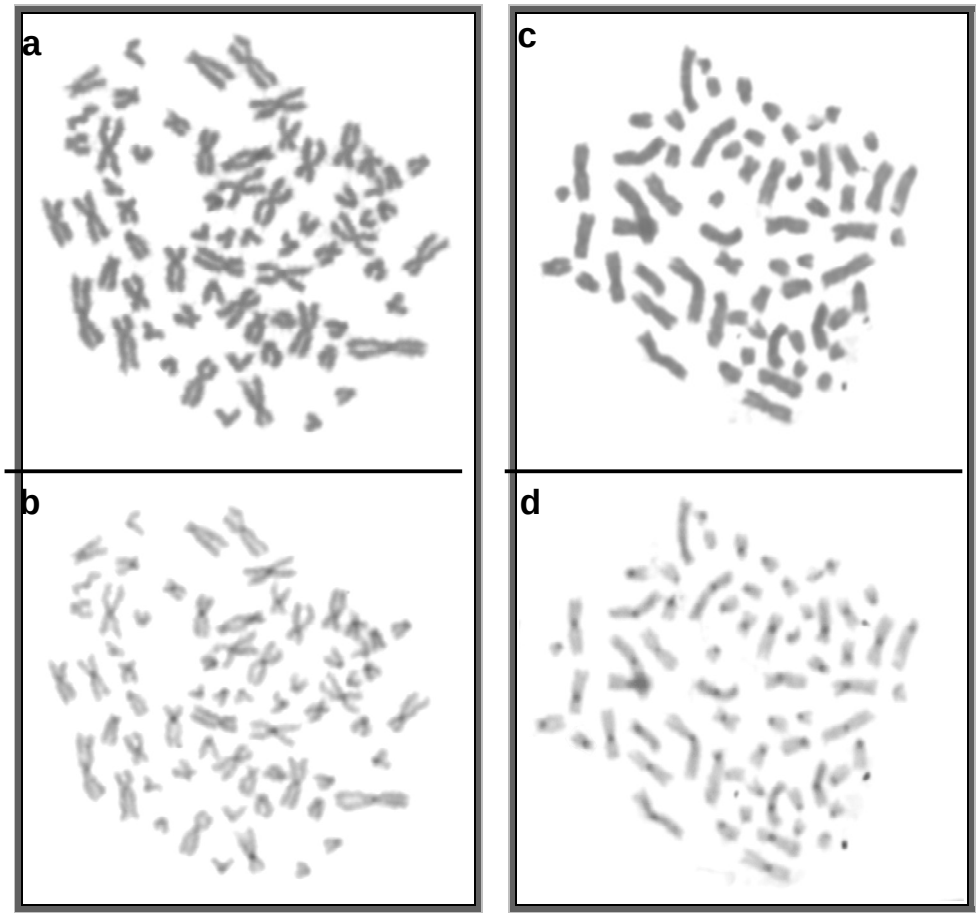


Figura 18 – Metáfases somáticas de *Potamotrygon falkneri* (fêmea), da população de Porto Rico, (a) após coloração convencional com Giemsa, análise sequencial da heterocromatina constitutiva (b), *Potamotrygon falkneri* (macho) da população de Ilha Solteira após coloração convencional com Giemsa (c), e identificação da heterocromatina constitutiva (d).

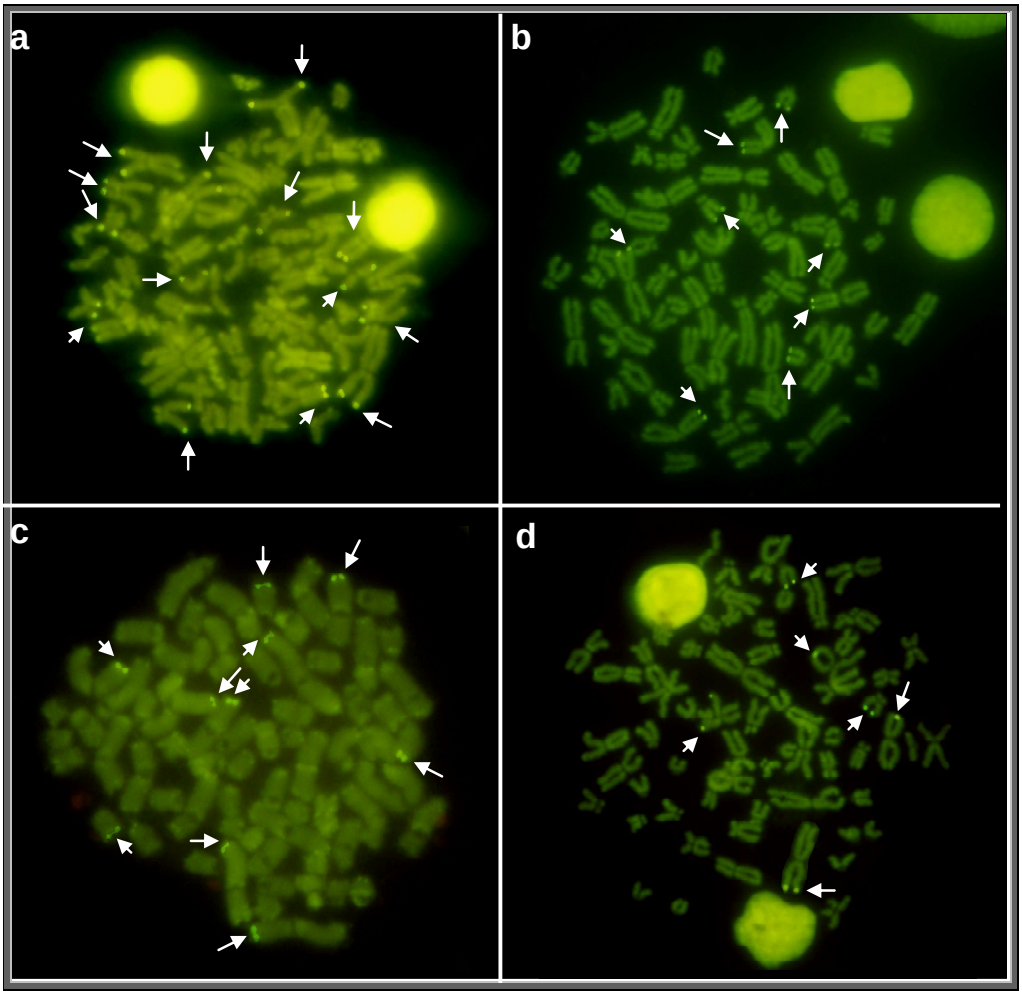


Figura 19 – Metáfases somáticas, após coloração com o Fluorocromo CMA_3, de *Potamotrygon motoro* (a) população de Porto Rico, (b) população de Ilha Solteira, e *Potamotrygon falkneri* (c) população de Porto Rico, (d) população de Ilha Solteira, as setas representam os sítios GC-positivos.

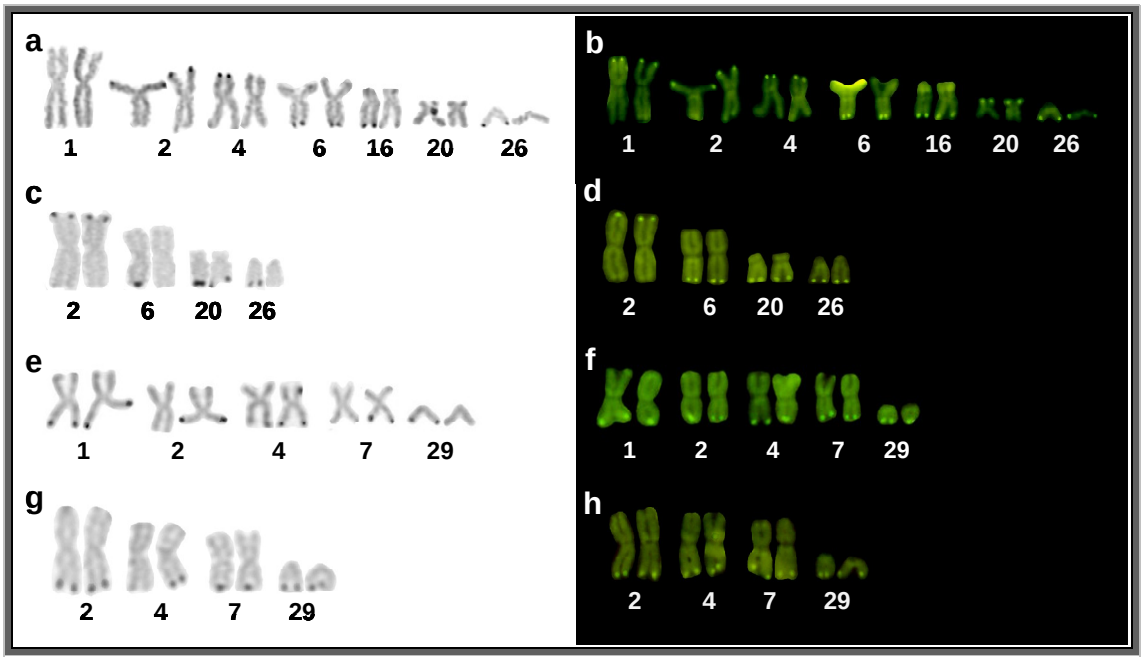


Figura 20 – Identidade das marcações Ag-RON e cromomicina (CMA_3) em cromossomos de raias de água doce. Cariótipos parciais de: a) *Potamotrygon motoro* (Porto Rico), após emprego da técnica de Ag-RON; b) *P. motoro* (Porto Rico), após coloração com o fluorocromo CMA_3; c) *P. motoro* (Ilha Solteira), após emprego da técnica de Ag-RON; d) *P. motoro* (Ilha Solteira), após coloração com o fluorocromo CMA_3; e) *Potamotrygon falkneri* (Porto Rico), após emprego da técnica de Ag-RON; f) *P. falkneri* (Porto Rico), após coloração com o fluorocromo CMA_3; g) *P. falkneri* (Ilha Solteira), após emprego da técnica de Ag-RON; h) *P. falkneri* (Ilha Solteira), após coloração com o fluorocromo CMA_3.

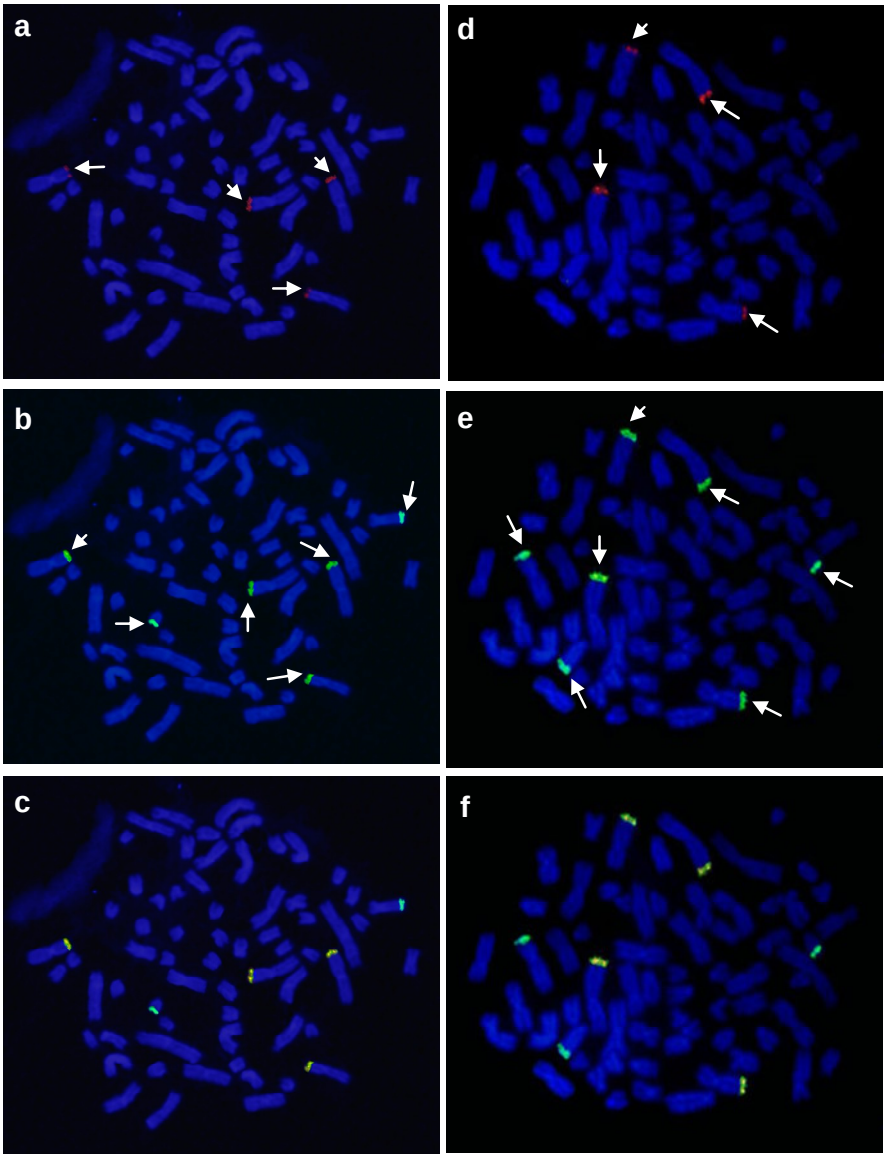


Figura 21 – Metáfase somática de *Potamotrygon motoro* (fêmea), após hibridação *in situ* fluorescente, da população de Porto Rico, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (a), 18S (b), e localização simultânea das sondas (c). *Potamotrygon motoro* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (d), 18S (e) e localização simultânea das sondas (f). As setas indicam a localização dos sítios ribossomais.

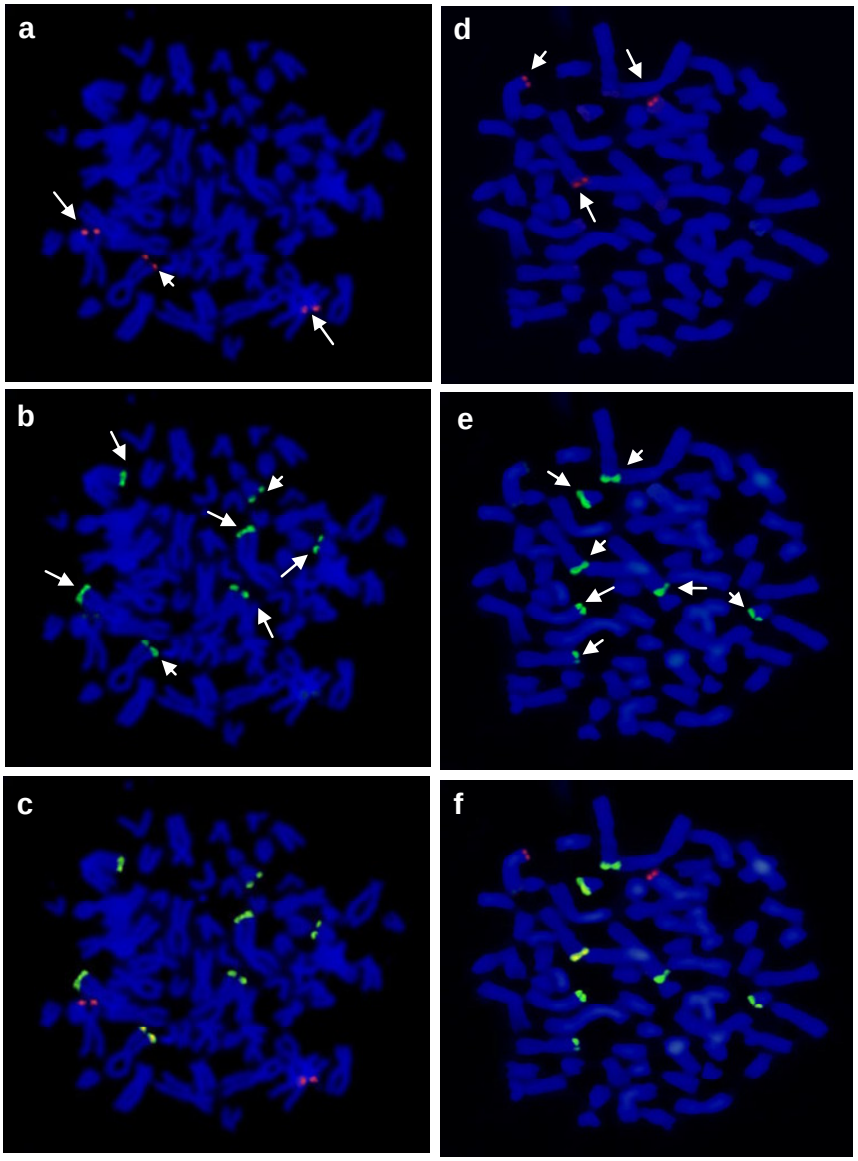


Figura 22 – Metáfase somática de *Potamotrygon falkneri* (fêmea), após hibridação *in situ* fluorescente, da população de Porto Rico, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (a), 18S (b), e localização simultânea das sondas (c). *Potamotrygon falkneri* (fêmea) da população de Ilha Solteira, evidenciando a localização dos genes ribossomais 5S (d), 18S (e) e localização simultânea das sondas (f). As setas indicam a localização dos sítios ribossomais.

CAPÍTULO 3

ORGANIZAÇÃO MOLECULAR E MAPEAMENTO GENÔMICO DE DUAS CLASSES DE DNAr 5S EM *Potamotrygon motoro* (CHONDRICHTHYES: POTAMOTRYGONIDAE).

RESUMO

A organização de genes ribossômicos 5S tem sido objeto de crescente interesse, sendo estes segmentos genômicos amplamente caracterizados em eucariotos e peixes ósseos. Ao contrário, entre os peixes cartilaginosos, tais informações ainda são muito restritas, com apenas algumas espécies estudadas. O DNA ribossômico 5S apresenta repetições geralmente estruturadas na forma de uma sequência codificante e de um espaçador não-transcrito (NTS), que é comumente variável em sua sequência nucleotídica. Embora a sequência nucleotídica deste gene seja altamente conservada mesmo entre espécies não relacionadas, as variações nos NTSs geralmente são espécies-específicas e têm sido utilizadas com sucesso em estudos evolutivos. Na presente investigação, a partir do DNA total da espécie, o segmento correspondente ao rDNA foi clonado e sequenciado. Os dados obtidos evidenciaram que o gene para DNAr 5S em *Potamotrygon motoro,* é formado por duas classes de segmentos com diferentes tamanhos, sendo uma menor com cerca de 342pb (Classe I) e outra maior com 1900pb (Classe II). O sequenciamento permitiu identificar uma sequencia consenso para cada classe e o alinhamento dos clones obtidos revelou poucas alterações nas sequências da região codificadora (5S). Já as sequencias das regiões dos espaçadores não transcritos (NTS) mostraram um maior número de alterações, devido às características destas regiões do NTS que se apresentam sempre muito variáveis. Sequências TATA-like foram encontradas nos NTS e um microssatélite (GCT_{10}) foi identificado no segmento genômico do NTS II. A partir de preparações cromossômicas mitóticas obtidas de exemplares de *P. motoro* foi montado o cariótipo e, com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando como sondas os segmentos componentes do gene ribossômico 5S marcados com corantes fluorescentes permitiu mapear o genoma da espécie caracterizar sua localização nos cromossomos da espécie. Estes segmentos estão localizados nas regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos do par 2 e nos braços longos do par 6, sendo sintênicos nos cromossomos do par 2. Por se tratar do primeiro estudo realizado em espécie de raias de água doce, os

resultados obtidos poderão auxiliar na compreensão da organização e distribuição do DNAr 5S em peixes cartilaginosos e nos processos envolvidos na diversificação e evolução das espécies neste grupo.

Palavras-Chave: Chondrichthyes, peixes cartilaginosos, *Potamotrygon motoro*, DNAr 5S.

INTRODUÇÃO

Um dos mais efetivos métodos de estudo citogenético de peixes cartilaginosos tem sido a combinação de técnicas clássicas de bandamento cromossômico, técnicas citogenéticas moleculares e hibridação *in situ* (ROCCO *et al*., 2006). Os genes para RNAs ribossômicos (RNAr) encontram-se organizados como duas famílias multigênicas distintas, representadas pelo DNAr 45S e pelo DNAr 5S, compostas por unidades repetidas *"in tandem*" com centenas à milhares de cópias (LONG & DAVID, 1980).

O DNAr 45S consiste de unidades transcricionais que codificam os RNAs ribossômicos 18S, 5.8S e 28S, separadas por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores externos transcritos (ETS1 e ETS2) e não-transcritos (NTS) (LONG & DAVID, 1980). Múltiplas cópias destas unidades correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Diversos trabalhos têm demonstrado que várias espécies de peixes apresentam somente dois cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos (VENERE & GALETTI, 1989; PAULS & BERTOLLO, 1990; MARTINS & GALETTI, 1999), enquanto outras possuem múltiplos cromossomos portadores de RONs (GALETTI *et al.* 1985; FORESTI *et al.,* 1989; SOLA *et al.,* 1990, 1992; WASKO & GALETTI, 1998).

O DNA ribossômico 5S apresenta repetições que consistem de uma sequência codificante de 120 pares de bases e de um espaçador não-transcrito (NTS) que é comumente variável em sua sequência nucleotídica devido a

inserções/deleções, mini-repetições e pseudogenes (LONG & DAVID, 1980). Embora a sequência nucleotídica do gene RNAr 5S seja altamente conservada mesmo entre espécies não relacionadas, as variações nos NTSs geralmente são espécies-específicas (SUZUKI *et al*. 1994; PENDÁS *et al*. 1995) e têm sido utilizadas com sucesso em estudos evolutivos (SUZUKI *et al*. 1994; UDOVICIC *et al*. 1995; CRONN *et al*. 1996; SAJDAK *et al*. 1998; CRISP *et al*. 1999; MARTINS & GALETTI, 1999; BAKER *et al*. 2000).

A localização cromossômica do DNAr 5S também tem sido reportada em muitas espécies de peixes (PENDÁS *et al*, 1994; MORÁN *et al.* 1996; MARTÍNEZ *et al.* 1996; SAJDAK *et al*. 1998; MARTINS & GALETTI, 1999, 2001, MURAKAMI & FUJITANI 1998; GORNUNG *et al.* 2000; ROCCO *et al*. 2004, ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002, entre outros), bem como as características da sua organização molecular (MARTINS *et al.* 2000, MESSIAS *et al.* 2003, ROCCO *et al.* 2004, MARTINS & WASKO 2004, PICHIRI *et al.* 2006, PASONALI *et al.* 2006, FUJIWARA *et al.* 2008, MORESCALCHI *et al*. 2008, entre outros). Assim, a ampliação de estudos envolvendo estes marcadores em espécies de peixes neotropicais mostra-se de grande interesse, tendo em vista a diversidade de espécies existentes nesta região.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 10 exemplares de *Potamotrygon motoro* provenientes da bacia hidrográfica do alto Paraná, na região de Porto Rico – PR, coletados entre os anos de 2007 a 2008.

Cromossomos mitóticos foram obtidos pela suspensão de células do rim com base no método descrito por FORESTI *et al.* (1981), com algumas adaptações. Um conjunto de dos *primers* 5SA (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC-3') e 5SB (5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC-3'), propostos por PENDÁS *et al*. (1994), foi utilizado para amplificação dos genes RNAr 5S e seus espaçadores não

transcritos. As sondas foram marcadas pelo método de nick translation utilizando o Kit BioNick ^{TM} Labeling System (Invitrogen).

Amostras de DNA de interesse isoladas de gel de agarose foram ligadas aos plasmídeos pGEM-T (utilizando o kit de ligação pGEM-T Vector System I - Promega), seguindo as especificações dos fabricantes. Posteriormente, foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as ligações inserto-plasmídeo foram submetidas a reações de amplificação (PCR), seguindo o protocolo descrito. Em um tubo de 0.5ml, foi adicionado 50pmol de cada *primer* - M13F (5'- 3') AGCGGATAACAATTTCACACAGG, e M13R (5'- 3') CCCAGTCAC GACGTTGTAAAACG, tampão de reação 1x (KCl 50mM; $MgCl_2$ 1.5mM; Tris-HCl 10mM), 2mM de cada dNTP e 0.5U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech), em um volume total de 50μl. A metodologia empregada para a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos foi baseada em procedimentos adotados por PINKEL *et al*. (1986) e em adaptações apresentadas por MARTINS & GALETTI (1999) e WASKO & GALETTI (2000). O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Bio-Sciences) e seqüenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer), seguindo as especificações dos fabricantes. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando os programas BIOEDIT (HALL, 1999) e DAMBE (XIA e XIE, 2001). Para identificação de possíveis homologias, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas a buscas online BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") (ALTSCHUL *et al*. 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), "website" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (THOMPSON *et al*. 1997). Análises de distância genética foram realizadas pelo parâmetro Kimura-2 (KIMURA, 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequências de DNAr 5S foram isoladas por PCR a partir do DNA genômico de exemplares de *Potamotrygon motoro* da população de Porto Rico, capturadas no rio Paraná. Em todos os exemplares analisados, os produtos de PCR apresentaram duas bandas amplificadas, sendo uma com cerca de 342pb e outra maior com cerca de 1900pb (Figura 23), demonstrando a existência de duas classes distintas de DNAr 5S, sendo a menor identificada como Classe I e a maior Classe II.

A diferença observada entre as duas prováveis classes isoladas deste DNA ribossomal relaciona-se à diferença de tamanho dos NTSs e é vista como uma tendência generalizada nos grupos dos vertebrados, tornando este polimorfismo útil como marcador genético para espécies intimamente relacionadas, subespécies, linhagens e híbridos (PENDÁS *et al.* 1995) e em análises evolutivas (SUZUKI *et al.* 1994, UDOVICI *et al.* 1995, JOFFE *et al.* 1995, CRONN *et al.* 1996, CRISP *et al.* 1999, BAKER *et al.* 2000).

Através da hibridação *in situ* de sondas específicas de DNAr 5S com sondas marcadas correspondentes aos segmentos da Classe I (biotina) e Classe II (digoxigenina), foi possível identificar a localização exata das regiões de DNAr 5S nos cromossomos de *P. motoro,* demonstrando que essas duas classes de rDNA localizam-se nas regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos do par 2 e nos braços longos do par 6, sendo sintênicas nos cromossomos do par 2 (Figura 24). A co-localização cromossômica de duas classes de DNAr 5S também foi encontrado em espécies de *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002). Porém tal localização mostra-se diversa do padrão mais comumente observado em outras espécies de peixes, em que os genes RNAr 5S encontram-se localizados em vários cromossomos (MARTINS e WASKO, 2004), como observado em espécies de *Leporinus* (MARTINS e GALETTI, 2001).

A clonagem e sequenciamento dos fragmentos de DNA correspondentes ao gene RNAr 5S por PCR revelaram um alto grau de conservação em relação o posicionamento das bases. Essas sequências foram blastadas para confirmação do fragmento 5S clonado e, devido ao tamanho do fragmento Classe II (1900pb), o sequenciamento foi realizado apenas em uma região flanqueadora, totalizando 912pb.

O alinhamento das sequências obtidas permitiu a elaboração de uma sequência consenso de 342pb, com 52,7% de AT e outra com 912pb, como 43% de AT (Figura 25). A divergência genética verificada entre os clones da Classe I indicaram uma baixa divergência (0,7%), sendo valores compatíveis também encontrado para a Classe II (0,8%) (Tabela 5). Embora a região gênica seja extremamente conservada, foi possível identificar substituições nucleotídicas características de cada um dos tipos de repetições. No entanto, as repetições de maior tamanho apresentaram-se mais variáveis quando comparadas às repetições menores que se mostraram mais conservadas.

Estudos realizados em várias espécies de peixes permitiram a identificação de tipos variantes de repetições *in tanden* no DNAr 5S, caracterizadas por marcantes diferenças no NTS. A presença de duas classes de DNAr 5S tem sido observada em Characiformes (MARTINS e GALETTI, 2001; WASKO *et al*., 2001), Symbranchiformes (MESSIAS *et al.,* 2003), Perciformes (MARTINS e GALETTI, 1999), Salmoniformes (PENDÁS *et al*., 1994; MORÁN *et al*., 1996; SAJIDAK *et al*., 1998), Rajidiformes (PASOLINI *et al.,* 2006), Polypteriformes (MORESCALCHI *et al*., 2008) e em Cypriniformes (FUJIWARA *et al.* 2008), sendo uma característica aparentemente bastante comum entre os peixes.

O uso das repetições do DNAr 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de sequências codificantes, conservadas, flanqueando regiões variáveis dos NTSs, favorecem a aplicação da técnica de PCR e, consequentemente, o isolamento dos NTSs das mais diferentes espécies sem necessidade de um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão (MARTINS e WASKO, 2004).

Embora os NTSs parecem não ter função específica, tem sido encontrada em diversos mamíferos uma sequência denominada TATA-like (modificada por TTAA e AATT) localizada ao longo dos NTSs desempenhando um papel importante na regulação de sua expressão (NEDERBY-NIELSEN *et al*., 1993; SUZUKI, SAKURAI & MATSUDA, 1996). Em peixes a sequencia TATA-like tem sido observada a montante do gene 5S (PENDÁS *et al.* 1994; INAFUKU *et al.* 2000, MARTINS e GALETTI, 2001). Estudos realizados em raias marinhas, também apresentaram sequências TATA-like ao longo do gene ribossomal 5S (ROCCO *et al.* 2004, PASOLINI *et al*. 2006) assim como encontrado neste estudo em *P. motoro,* que apresentou tetranucleotídios TATA-like ao longo de suas sequências (Figura 25). MARTINS e GALETTI (2001) sugerem que esta sequência poderia ter alguma influência sobre o nível de transcrição dos genes 5S rRNA.

O alto dinamismo dos NTS pode ser observado também pela presença de um microssatélite (GCT_{10}) (Figura 25) neste segmento genômico, que poderia representar um potencial marcador genético a ser melhor explorado e utilizado para análises populacionais nesta espécie. A presença de microssatélites nas regiões NTS do gene ribossomal 5S também é encontrado em outras espécies de peixes, como em *Micropterus salmoides* (DEIANA *et al.* 2000), *Aulopus japonicus* (OTA *et al.* 2003), *Danio rerio* (GORNUNG *et al*. 2000), raias da família Rajidae (PASOLINI *et al.* 2006), *Anguilla anguilla* (PICHIRI *et al.* 2006), *Leporinus macrocephaus* (FERREIRA *et al.* 2007), *Polypterus senegalus* (MORESCALCHI *et al.* 2008), entre outros.

Em conclusão, o estudo da organização dos genes ribossomais e sua localização cromossômica, sem dúvida, oferece uma gama de informações úteis, especialmente quando integrado com avaliações quantitativas e qualitativas utilizando hibridização *in situ* e análise de sequências repetitivas, tais como os microssatélites, presentes na região NTS. Desta forma seria possível obter uma melhor compreensão sobre o processo de evolução e especiação desta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Renato Devidé pela assistência técnica, ao apoio financeiro concedido pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C., FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F., CÉLINE E. LOPES, DANIEL, M.F.Z., TOLEDO FILHO, S.A. Conservation of 5S bearing pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenetic and Genome Research, 97:229-233, 2002.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410, 1990.

BAKER WJ, HEDDERSON TA, DRANSFIELD J. Molecular phylogenetic of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetic Evolution 14*: 218-231, 2000.

CRISP MD, APPELS R, SMITH FM, KEYS WMS. Phylogenetic evaluation of 5S ribosomal RNA gene and spacer in the *Callistachys* group (Fabacea: Mirbelieae). *Plant Systematics and Evolution 218*: 33-42, 1999.

CRONN RC, ZHAO X, PATERSON AH, WENDEL JF. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular Evolution 42*: 685-705, 1996.

DEIANA AM, CAU A, SALVADORI S, COLUCCIA E, CANNAS R, MILIA A, TAGLIAVINI J. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass Micropterus salmoides (Perciformes, Centrachidae) are localized in GC-rich regions of the genome. Chromosome Res 8:213–218, 2000.

FERREIRA, I.A., OLIVEIRA, A. VENERE, P.C., GALETTI, P.M. E MARTINS, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus Leporinus (Characiformes: Anostomidae). Genetica 129:253-257, 2007.

FORESTI F., ALMEIDA-TOLEDO L.F, TOLEDO F.S. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization, and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica 79: 107-114, 1989.

FUJIWARA, M.; INAFUKU, J.; TAKEDA, A.; WATANABE, A.; FUJIWARA, A.; KOHNO, S.AND KUBOTA, S. Molecular organization of 5S rDNA in bitterlings (Cyprinidae). Genetica, DOI 10.1007/s10709-008-9294-2, 2008.

GALETTI JR., P.M., SILVA, E.B., CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev Brasil Genet 8*: 479-484, 1985.

GORNUNG E, DE INNOCENTIIS S, ANNESI F, SOLA L. Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3. Chromosome Res 8:362-362, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, 1999.

INAFUKU J, NABEYAMA M, KIKUMA Y, SAITOH J, KUBOTA S, KOHONO S. Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). Chromosome Res 8:193199, 2000.

JOFFE BI, VALIEJO-ROMAN KM, BIRSTEIN VY, TROITSKY AV. 5S rRNA sequences of 12 species of flatworms: implications for the phylogeny of the Platyhelminthes*. Hydrobiologia 305*: 37-43, 1995.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111-120, 1980.

LONG, E.O. & DAVID, J.B. Repeated genes in eukaryotes. Ann. Ver. Biochem., v.49, p.727-764, 1980.

MARTINEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (Anguilla anguilla). Cytogen Cell Genet., v.73; p.149-152, 1996.

MARTINS, C. & GALETTI, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Chraciformes). Chromosome Research 7: 363-367, 1999.

MARTINS C, WASKO AP, OLIVEIRA C, WRIGHT JM. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. Hereditas 133: 39-46, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI, P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome 44*: 903-910, 2001.

MARTINS C, WASKO AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) Focus on Genome Research. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 335-363, 2004.

MESSIAS LH, FERREIRA DC, WASKO AP, OLIVEIRA C, FORESTI F, MARTINS C. 5S rDNA organization in the fish Synbranchus marmoratus (Synbranchidae, Synbranchiformes). Hereditas 139:228-231, 2003.

MORÁN P, MARTÍNEZ JL, GARCIA-VÁSQUEZ E, PENDÁS AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics 75*: 145-150, 1996.

MORESCALCHI, M.A; LIGUORI, L.; ROCCO, L.; ARCHIMANDRITIS, A. & STINGO, V. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in Polypterus senegalus (Osteichthyes, Polypteridae). Genetica, 132: 179-186, 2008.

MURAKAMI M, FUJITANI H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, Carassius auratus langsdorfi). Genes Genet Syst 73:9-20, 1998.

NEDERBY-NIELSEN, J., C. HALLENBERG, S. FREDERIKSEN, P.D. SORENSEN, B. LOMHOLT, ET AL.Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by upstream DNA sequence. Nucleic Acids Res. 26: 3631–3636, 1993.

OTA, K., TATENO Y, GOJOBORI T. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). Gene 317:187–193, 2003.

PASOLINI, P., COSTAGLIOLA D, ROCCO L, TINTI F. Molecular organization of 5S rDNA in Rajidae (Chondrichthyes): Structural features and evolution of piscine 5S rRNA genes and nontranscribed intergenic spacers. J Mol Evol 62:564-574, 2006.

PAULS, E. & BERTOLLO, L.A.C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica 81*: 117-123, 1990.

PENDÁS AM, MORÁN P, FREIJE JP, GARCIA-VASQUEZ E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenet Cell Genet 67: 31-36, 1994.

PENDÁS AM, MÓRAN P, MARTÍNEZ JL, GARCIA-VÁSQUEZ E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brow trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology 4*: 275-276, 1995.

PICHIRI, G.; NIEDDU, M.; MANCONI, S.; CASU, C.; CONI, P.; SALVADORI, S. And MEZZANOTTE, R. Isolation and characterization of two different 5S rDNA in Anguilla anguilla and in Anguilla rostrata: possible markers of evolutionary divergence. Molecular Ecology Notes, v.6, 638-641, 2006.

PINKEL, D.; STRAUME, T. E GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934-2938, 1986.

ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; FIORILLO, M.; TINTI, F. & STINGO, V. Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, *Taenura lymma* and *Raja montagui* (Chondrichthyes, Batoidea). Genetica 123: 245–253, 2004.

ROCCO, L.; PIZANO, E.; OZOUF COSTAZ, C.; FORESTI, F. & KAPOOR, B. Fish Cytogenetycs. Editora Science Publishers, England, 2006.

SAJDAK SL, REED KM, PHILLIPS RB. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *Journal of Molecular Evolution 46*: 680-688, 1998.

SOLA, L., MONACO, P.J., RASCH, E.M. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NORs polymorphisms and sex-chromosomes in three populations of *Poecilia latipina*. Cytogenet Cell Genet 53: 148-154, 1990.

SOLA, L., ROSSI, A.R., IASELLI, V., RASCH, E.M., MONACO, P.J. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding,

DAPI, quinacrine, chromomycin A_3 and silver staining. Cytogenet Cell Genet 60: p.229-235, 1992.

SUZUKI H, MORIWAKI K, SAKURAI S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs*. Molecular Biology Evolution* 11: 704-710, 1994.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. Cytogenet. Cell Genet, v. 72, p.1-4, 1996.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882, 1997.

UDOVICIC F, MCFADDEN GL, LADIGES PY. Phylogeny of *Eucaliptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogeny and Evolution 4*: 247-256, 1995.

VENERE, P.C. & GALETTI, JR P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. Revista Brasileira de Genética 12: p.17-25, 1989.'

XIA, X. & XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J. Heredity 92:371-373, 2001.

WASKO, A.P. & GALETTI, JR.,P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish Bryconamericus (Characidae). Cytologia 64:63-67, 1998.

WASKO AP AND GALETTI JR PM. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Genetics and Molecular Biology 23: 135-138, 2000.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALETTI, JR.,P.M. Molecular organization of 5S rRNA in fishes of the genus *Brycon*. Genome, v.44, p.839-902, 2001.

Tabela 5 – Análise da distância genética entre os clones da Classe I e os clones da Classe II; NC - número de clones; PB - número de bases; DG - divergência genética, DP - desvio padrão.

	Classe I			**Classe II**		
	NC	**PB**	**DG ± DP**	**NC**	**PB**	**DG ± DP**
DNAr 5S						
P. motoro	09	342	0,007 ± 0,003	08	912	0,008 ± 0,004

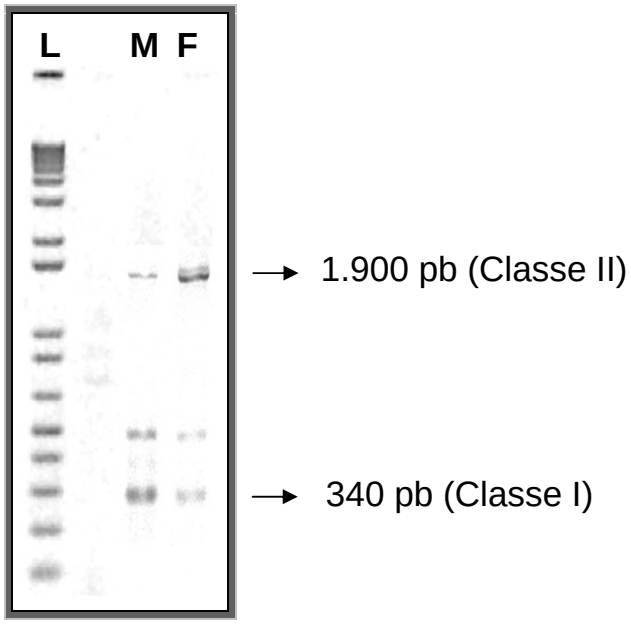


Figura 23 – Amplificação de repetições de DNAr 5S de *Potamotrygon motoro,* população de Porto Rico, visualizadas em gel de agarose 2%. (M) corresponde a uma amostra de DNA de um exemplar macho, (F) corresponde a uma amostra de DNA de um exemplar fêmea, (L) marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen Life Technologies).

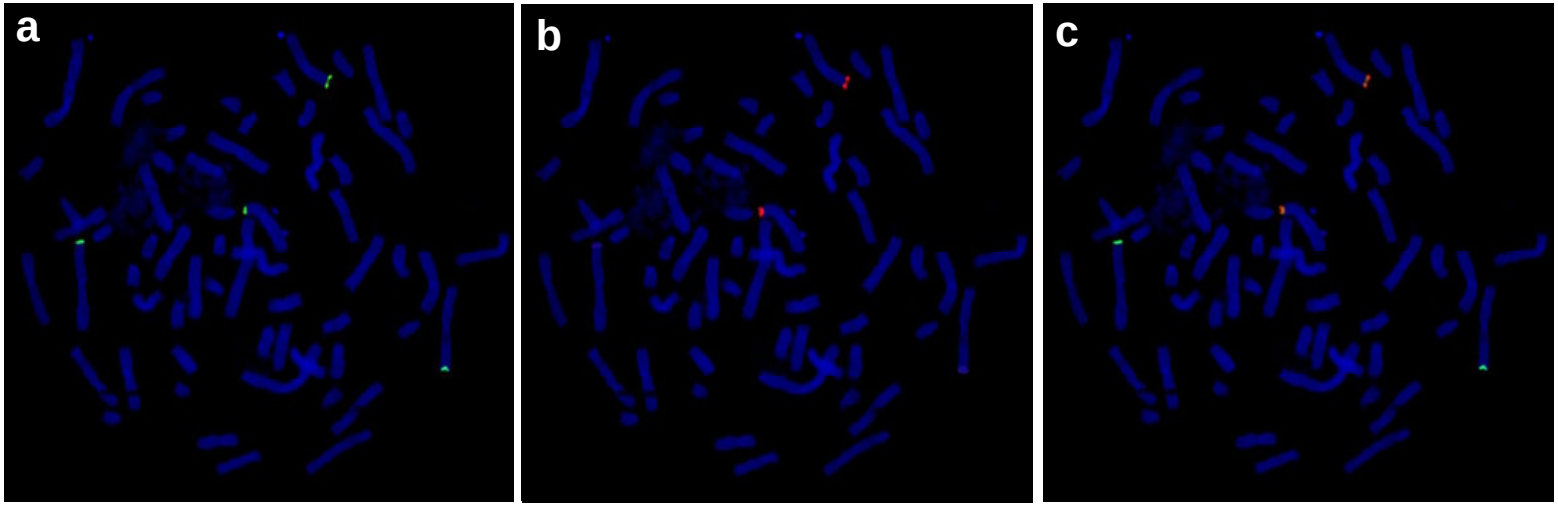


Figura 24 – Metáfases de *Potamotrygon motoro* da população de Porto Rico, (a) após hibridação *in situ* com a sonda DNAr 5S de 342pb (Classe I) (verde); (b) após hibridação *in situ* com a sonda DNAr 5S de 1900pb (Classe II) (vermelho); (c) resultado de Double-FISH demonstrando marcação com as duas sondas simultaneamente.

+1

```
5S II CAGGCTGGTATGGCCGTAAGCTACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGC [ 50]
5S I  ..........................................C.....C. [ 50]

5S II TAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAAT [100]
5S I  .GG...A.........C...CA.G.C.CTG.A.....T........... [100]
                   +120
5S II ACCAGGTGCCGTAGGCTTTTGCTGTTTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG [150]
5S I  T......T.T...CA..GA.A.ACG.GA.T.A-....T..C.CT..CAAA [150]

5S II CTGCTGCTCTGAACAGATGTCCGCAGTAGGAGCTGCTCTCTTCTTTTCAG [200]
5S I  T...A.T.-....TTC.ATCAT.TTA.GACCA....-------..C..A.. [200]

5S II TCCGCCTCTGACATACACTGTCGGCACTGCGCTTCTCACTCAGCCCAGAA [250]
5S I  ---.GT...TTT.C...G.AAG.AATTAAA------GA.T.TGGGGA.. [250]

5S II ACGCAAGCACCCGGCTCCTGCTGTCAAGGCACAGGAATACAAGAATGTGC [300]
5S I  .G...G.T.GAT.AA----.....-.GCTT..G.CC....C..CC..A-- [300]

5S II TTTTGCGAGGCAGCCAGCTGCACCTGCAGCACTAGCGTCCTCATTGCTTC [350]
5S I  -C..A..GCCATA.....CAGG.T.A.G..CA..C.AG...G-------- [350]

5S II CTCCATACCGCCGCGCATCGCCACTCGCCTACTGTCGCCTCTCCCTCAGT [400]
5S I  -------------------------------------------------- [400]

5S II CTCAGCCAGGCAGCAAGATGCAAGATGCAAGGGGCTCAAGCGTTCTTGCG [450]
5S I  -------------------------------------------------- [450]

5S II CCTCTCTTCTGCGCTTGCGCAAACCGTCCATTCTCAGTTGAGGCTTTCCT [500]
5S I  -------------------------------------------------- [500]

5S II TTGCCTTCTGAGCAGGCATCAGCAAAGGCGGCAGCTGCTTCCTGCGGCCA [550]
5S I  -------------------------------------------------- [550]

5S II AGCGGGCTGGCCGAGTATGGCACAAGCAGCTCYGAATAGCCTCTGATGGC [600]
5S I  -------------------------------------------------- [600]

5S II TGAGACTCAGCAGCCTGTTCCTGAGCGAGCCGTCGGCCTGGCAGTGGGCA [650]
5S I  -------------------------------------------------- [650]

5S II GACTCACCCAGGCCCACCCAGGTCTGAGGACGGTTAGCTCAGCTGGTCAG [700]
5S I  -------------------------------------------------- [700]

5S II AGCGTTGCTAATAACGCCAAGGTCGTGGGTTCGATCCCCATACTGTCCAC [750]
5S I  -------------------------------------------------- [750]

5S II GCCCCGCATTTCCTTTAATTTCCGCCCACTTTCGTCCAGCAGTCCAGCAC [800]
5S I  -------------------------------------------------- [800]

5S II TTCTCTGGCTATCCAATGTAGGACATGGCTGGATGGCKGGCGCTTCAGCA [850]
5S I  -------------------------------------------------- [850]

5S II GAAAAGCAGGCCCCGTGCAGTATGCAGCAGCGTAATTCACGGGAACTGAA [900]
5S I  -------------------------------------------------- [900]

5S II TGAATGAACGAA [912]
5S I  ------------ [912]
```

Figura 25 – Sequências consenso de DNAr 5S Classe I (5S I) e Classe II (5S II) alinhadas da espécie *Potamotrygon motoro*. A região de transcrição se inicia no +1 e termina no +120 (está em negrito). As sequências TATA-like estão contornadas por retângulos. A sequência nucleotídica grifada indica uma região microssatélite GCT_{10}. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos e gaps estão indicados pelos traços.

Discussão Geral

Rio Paraná – Próximo ao município de Porto Rico-PR.

DISCUSSÃO GERAL

As duas espécies de raias de água doce analisadas apresentaram o mesmo número diplóide e cariótipos similares, porém não idênticos, e com diferenças em suas fórmulas cariotípicas, principalmente devido a existência de diferentes números de cromossomos acrocêntricos. As variações cariotípicas encontradas nas populações são resultados de rearranjos cromossômicos, principalmente do tipo fusão e fissão, que podem ser considerados como mecanismos importante de diversificação e evolução cariotípica dessas espécies. A existência de diferentes fórmulas cariotípicas pode ser uma indicativa da existência de um complexo de espécies de raias neste ambiente e que necessita ser melhor estudado

Foram evidenciadas diferenças cariotípicas entre fêmeas e machos nas duas espécies analisadas, sendo identificado um heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo, sugerindo a ocorrência do sistema de determinação sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Este poderia ter ocorrido a partir de translocações recíprocas, com modificações cariotípicas envolvendo os cromossomos de um ancestral com sistema simples e indiferenciado do tipo XY. VALENTIN (2001) relatou um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/X0 em raias da espécie *Potamotrygon sp*., proveniente do médio rio Negro, que também apresentou heteromorfismo ligado ao sexo. Porém, quando realizada a análise cariotípica de indivíduos da espécie *P. motoro* (médio rio Negro), todos os exemplares de ambos os sexo apresentaram o mesmo número cromossômico, não sendo corroborado o heteromorfismo cromossômico anteriormente descrito e diferentemente do encontrado neste trabalho.

Em algumas espécies de peixes, os cromossomos sexuais são facilmente identificados através de técnicas como bandamento C (BETOLLO *et al.* 1997; ARTONI & BERTOLLO, 2002; PANSONATO, J.C. 2006). No caso das espécies de raias estudadas, contudo, não foi possível identificar os cromossomos envolvidos na determinação sexual através dos padrões de heterocromatina constitutiva obtidos tanto para *P. motoro* quanto para *P. falkneri*, pois a distribuição

de segmentos banda C positivos ocorreu nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos do complemento nas duas espécies.

Um outro marcador comumente utilizado para identificação de cromossomos sexuais, é representado pelos cístrons ribossômicos formadores das regiões nucleolares, e identificados pelo nitrato de Prata. Tais marcadores foram observados em cromossomos sexuais de peixes como em *Fundulus diaphanus* (HOWELL e BLACK, 1979), *Salvelinus alpinus* (REED e PHILLIPS, 1995), *Triportheus guentheri* (ARTONI *et al.* 1999), *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000) e *Hisonotus* sp. A (ANDREATA *et al.* 2002). Em *P. motoro* e *P. falkneri*, as RONs não foram localizadas nos cromossomos sexuais e apresentaram marcações que variaram entre sete cromossomos, sempre em regiões terminais e de tamanhos semelhantes entre si. As RONs também foram identificadas através do fluorocromo CMA3, que em peixes, geralmente identifica RONs ativas e inativas. Em vista disso este tipo de abordagem deve ser feito com certas ressalvas, visto que podem ocorrer regiões cromossômicas igualmente ricas em GC, sem correspondência com as RONs (ARTONI *et al*. 1999). Tal situação foi observada neste estudo, onde além das RONs, outros segmentos cromossômicos também apresentaram reação positiva ao fluorocromo. As variações de sítios de RONs encontradas nessas populações, poderiam ser explicadas pela ocorrência de rearranjos cromossômicos como translocações, deleções, que resultaram na dispersão e/ou perda de genes ribossômicos (GALETTI *et al*. 1995; CASTRO *et al*. 1996; MANTOVANI *et al.* 2000).

A técnica de hibridação *"in situ"* do gene ribossomal 18S em *P. motoro* revelou as mesmas regiões encontradas pela impregnação por nitrato de Prata nas duas populações analisadas. O mesmo também ocorreu em *P. falkneri* na população de Porto Rico, mostraram a presença de um lócus de DNAr 18S em adição aos seis cromossomos coincidentes detectados pelo nitrato de Prata, o mesmo foi identificado pela $CMA_{3.}$ Na população de Ilha Solteira, as regiões encontradas pela Prata foram coincidentes com as evidenciadas pela sonda DNAr 18S e o fluorocromo CMA_3; este último também evidenciou sítios adicionais. É

relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios identificados pela hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S, que aqueles visualizados pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, como já observado em *Hoplias malabaricus* (BORN & BERTOLLO, 2000) *Astyanax scabripinnis* (FERRO *et al.* 2001; KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003), *Prochilodus lineatus* (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2003), entre outros. Tal fato tem sido interpretado como decorrência da presença de segmentos nucleolares inativos no genoma das espécies.

A localização cromossômica do gene DNAr 5S tem sido descrita em vários grupos de peixes, como em Rajidiformes, Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes, e Tetraodontiformes e tem se mostrado de grande importância na compreensão da estrutura e organização desses cromossomos (MARTINS & WASKO, 2004). As duas espécies de raias analisadas no presente estudo apresentaram uma variação de 3 a 4 cromossomos apresentando sítios de DNAr 5S, sendo quatro *loci* DNAr 5S encontrados nas duas populações de *P. motoro*, e três *loci* nas populações de *P. falkneri*. O aumento dos sítios DNAr 5S, poderia estar correlacionado com uma dispersão dessas sequências gênicas, levando a um aumento da variabilidade genética para estas espécies.

A hibridação *in situ* com as sondas de DNAr 5S e 18S simultaneamente permitiu uma melhor análise na distribuição desses genes nos cromossomos. Os genes ribossomais 5S e 18S foram observados em uma condição de sintenia em ambas as espécies estudadas. Em *P. motoro* o gene ribossomal 5S localizou-se terminalmente no braço longo do par dois e do par seis, em posição adjacente à localização do gene 18S nas duas populações analisadas. Em *P. falkneri*, as duas populações apresentaram o segmento de DNAr 5S em posição terminal no braço longo do segundo par de um cromossomo metacêntrico, também em posição adjacente à localização do gene 18S. Além desse par, o DNAr 5S foi evidenciado no braço curto em um dos homólogos do par doze.

A organização sintênica dos genes ribossomais 5S e 18S constitui uma situação pouco frequente entre os vertebrados. Contudo, entre os peixes tal tipo de

associação cromossômica aparece com frequência, como observado em *Salmo solar* (PENDÁS *et al.* 1994), *Oncorhynchus mykiss* (MÓRÁN *et al.* 1996), em espécies do gênero *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002) e em *Taenura lymma* (ROCCO *et al.* 2004). MARTINS e GALETTI (2001) sugerem que este tipo de modelo não é acidental e que poderia fornecer alguma vantagem para a organização destes genes no genoma de vertebrados.

As seqüências de DNAr 5S isoladas a partir do DNA genômico de *Potamotrygon motoro* da população de Porto Rico apresentaram duas possíveis classes de DNAr 5S. A diferença observada entre as duas classes isoladas deste DNA ribossomal relaciona-se à diferença de tamanho dos NTSs e é vista como uma tendência generalizada nos peixes, tornando este polimorfismo útil como marcador genético para espécies intimamente relacionadas, subespécies, linhagens e híbridos (PENDÁS *et al.* 1995) e em análises evolutivas (SUZUKI *et al.* 1994, UDOVICI *et al.* 1995, JOFFE *et al.* 1995, CRONN *et al.* 1996, CRISP *et al.* 1999, BAKER *et al.* 2000).

Através da hibridação "*in situ"* de sondas específicas de DNAr 5S utilizando sondas marcadas correspondentes aos segmentos da Classe I e Classe II, foi possível identificar a localização exata das regiões de DNAr 5S nos cromossomos de *P. motoro,* demonstrando que essas duas classes de rDNA estão em sintenia em apenas um dos pares cromossômicos envolvidos. A co-localização cromossômica de duas classes de DNAr 5S também foi encontrado em espécies de *Astyanax* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.* 2002).

O alinhamento das seqüências obtidas permitiu a elaboração de uma sequência consenso, onde foi possível analisar a divergência genética entre os clones de cada Classe, indicando uma baixa divergência entre eles. No entanto, a Classe II (de maior tamanho) mostrou-se mais variável quando comparada à Classe I (menor) que se mostrou mais conservada. A presença de duas classes de DNAr 5S tem sido observada em outras espécies de raias, como descrito por ROCCO *et al.* 2004 e PASOLINI *et al*. 2006, sendo uma característica aparentemente comum entre os peixes cartilaginosos.

Estudos realizados em raias marinhas apresentaram sequências TATA-like ao longo do gene ribossomal 5S (ROCCO *et al.* 2004, PASOLINI *et al*. 2006). Do mesmo modo foi encontrado no presente estudo em *P. motoro.* Esta espécie apresentou tetranucleotídios TATA-like ao longo de suas sequencias (modificada como AATT e TTAA). Um microssatélite (GCT_{10}) também foi encontrado neste segmento genômico, que poderia representar um potencial marcador genético a ser melhor explorado e utilizado para análises populacionais nesta espécie. A presença de microssatélites nas regiões NTS do gene ribossomal 5S já foi descrita para outras espécies de peixes, como em *Micropterus salmoides* (DEIANA *et al.* 2000), *Aulopus japonicus* (OTA *et al.* 2003), *Danio rerio* (GORNUNG *et al*. 2000), raias da família Rajidae (PASOLINI *et al.* 2006), *Anguilla anguilla* (PICHIRI *et al.* 2006), *Leporinus macrocephaus* (FERREIRA *et al.* 2007), *Polypterus senegalus* (MORESCALCHI *et al.* 2008), entre outros.

Os dados de citogenética clássica e molecular obtidos de *P. motoro* e *P. falkneri* contribuem com informações de interesse para uma melhor compreensão cariotípica das espécies e como análise de distribuição dos genes ribossômicos. Além disso, a identificação das Classes de DNAr 5S, no gênero *Potamotrygon*, fornecem dados sobre a estrutura de segmentos cromossômicos específicos nesta espécie, contribuindo para uma melhor compreensão da estrutura genômica dos peixes.

Conclusão

Rio Paraná – Próximo ao município de Porto Rico-PR.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no estudo das características cromossômicas, nos seus aspectos estruturais e moleculares, realizadas em espécies e populações de peixes pertencentes ao gênero *Potamotrygon*, capturadas na bacia superior do rio Paraná, permitem concluir que:

1) As espécies analisadas *P. motoro* e *P. falkneri* apresentaram o número diplóide conservado, com 2n=66 cromossomos as fêmeas e 2n=65 cromossomos os machos. No entanto, nota-se uma heterogeneidade do ponto de vista citogenético nas populações analisadas, com variações na sua estrutura cariotípica. Tais modificações estruturais permitem sugerir a ocorrência de rearranjos cromossômicos como inversões e translocações, como responsáveis pelas modificações nas fórmulas cariotípicas durante o processo de diversificação cromossômica que poderiam estar dando origem a um complexo de espécie neste grupo.

2) As análises citogenéticas realizadas permitiram demonstrar a ocorrência de heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo em ambas as espécies, caracterizando um sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$.

3) A análise da heterocromatina constitutiva através do bandeamento C revelou um padrão bastante semelhante para todas as populações analisadas nas duas espécies de raias, com blocos heterocromáticos centroméricos em quase todos os cromossomos.

4) A impregnação por nitrato de Prata identificou RONs múltiplas com localização terminal nos cromossomos, variando de 5 a 7 RONs em todas

as populações analisadas. O tratamento com o fluorocromo CMA_3 mostrou marcações correspondentes com as posições das RONs em todas as populaçõe, evidenciando também a presença de sítios adicionais. Os diferentes números de marcações encontradas nas duas espécies se deve ao fato da ação dos elementos transponíveis que auxiliam na dispersões das RONs.

5) A apllicação da técnica de hibridação *"in situ"* com a sonda de DNAr 18S revelou uma variação de 6 a 7 cromossomos com marcações terminais nas populações analisadas, revelando as mesmas regiões identificadas pela Prata. A sonda de DNAr 5S apresentou de 3 a 4 cromossomos marcados, localizado também em regiões terminais, sendo algumas destas marcações sintênicas com as regiões de DNAr 18S.

6) A espécie *P. motoro* apresentou duas classe de DNAr 5S e podem ser interpretadas como unidades genômicas distintas, sendo denominadas Classe I (menor) e Classe II (maior), demonstrando grande variação nas regiões de NTSs entre as duas Classes.

7) A técnica de hibridação *"in situ"* com a sonda da Classe I revelou marcações em 4 cromossomos nas regiões terminais, já a hibridação *"in situ"* com a sonda da Classe II mostrou 2 marcações nas regiões terminais dos cromossomos, sendo sintênicas com a Classe I.

8) Estudos citogenéticos no gênero *Potamotrygon*, principalmente no que diz respeito ao uso da hibridação *"in situ"* com as sondas de DNAr 18S e 5S, ainda são totalmente escassos e os dados obtidos no presente trabalho poderão colaborar com informações para o entendimento dos padrões de diversificação, especiação e evolução deste grupo de peixes.

Referências Bibliográficas

Rio Paraná – Próximo ao município de Porto Rico-PR.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUÍN, M.; CLABBY, C.; MARTÍNEZ, P.; GOSWAMI, U.; FLAVIN, F.; WILKINS, N.P.; HOUGHTON, J.A.; POWELL, R.; SÁNCHES, L. A NOR associated repetitive element present in the genome two Salmo species (Salmo solar and Salmo truta). Genome 39:671-679, 1996.

ACHENBACH, G.M. & ACHENBACH, S.V.M. Notas acerca de algumas espécies de “raya fluvial” (Batoidei, Potamotrygonidae) que frecuentan el sistema hidrográfico del rio Paraná médio em el departamento La Capital (Santa Fé – Argentina). Comunicaciones del Museo Provincial de Ciências Naturales, 8: 1-34, 1976.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. (1997). Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Hahn, N.S. (Eds.). A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá, EDUE , 179-208.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., FORESTI F. and TOLEDO-FILHO S.A. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes). Genetica, v.64, p.165-169, 1984.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & TOLEDO, S.A. Diferenciação de regiões ricas em AT e GC em *Eigenmannia sp*. (Pisces, Sternopygidae), através da coloração por quinacrina e mitracina. Rev. Brasil Genet. 14 (3): 56, 1991.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. FORESTI, F., OLIVEIRA, C. A citogenética de Peixes no Brasil. X encontro brasileiro de ictiologia. Universidade São Paulo, pp. 347-363, 1993.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F., DANIEL-SILVA, M.F.Z., LOPES, C.E. and TOLEDO-FILHO S. A. Sistema de cromossomos sexuais com heterogametia masculina do tipo X1X1X2X2/X1X2Y em *Hypopomus* sp. (Gymnotoidei, Hypopomidae). In: Resumos do 41° Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG, p. 465, 1995.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. Phylogeny and classification of neotropical fishes, EDIPUCRS. Porto Alegre, p. 583-588, 1998.

ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S.A. Karyotipic evolution in Neotropical freshwater fish. *I*n Chromosome Today, v.13. Switzerland: Birkhauer Verlag, p. 169-182, 2000b.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. and FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. Genetica, v.111, p. 1-3, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO L.F., OZOUF-COSTAZ C., FORESTI F., BONILLO C., PORTO-FORESTI F. E DANIEL-SILVA M.F.Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA *cluster*s in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). Cytogenetic. Genome Res. 97 (3-4): 229-233, 2002.

ALMEIDA, M.P. Pesca, policromatismo e aspectos sistemáticos de Potamotrygon scobina Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da região da Ilha de Colares – Baía de Marajó – Pará. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará e Museu Paranaense Emílio Goeldi. 145p., 2003.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410, 1990.

ALVES, A. L. ; OLIVEIRA, CLAUDIO DE ; FORESTI, FAUSTO ; GRANADO, A ; NIRCHIO, M. Karyotypic relationships among tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish specie .. Genetica (The Hague), v. 128, p. 1-9, 2006.

AMEMIYA C.T. e GOLD J.R. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. Copeia, 1: 226-231, 1986.

AMEMIYA, C. T., GOLD, J. R. Chromosomal NORs as taxomic and systematic characters in North American cyprinidae fishs. Genetica 76: 81-90, 1988..

ANDREATA, A. A., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO FILHO, S. Studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Locariidae). I. XX/ XY Sex chromossome heteromorphims in *Pseudotocinclus tietensis*. Citologia *57*:369-372*,* 1992.

ANDREATA, A.A., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., OLIVEIRA, C., TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW Sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. Cytogenet. Cell Genet., v.63, p. 215-220, 1993.

ANDREATA, A.A. Estudos citogenéticos no gênero Microlepidogaster (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, 196p, 2002.

ARAÚJO, M.L.G. Biologia Reprodutiva e pesca de *Potamotrygon sp.* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia/ Universidade do Amazonas. 164 p, 1998.

ARAÚJO, M.L.G. Primeiro relatório parcial da situação dos estoques de arraia da família Potamotrygonidae utilizadas como Peixe Ornamental. Relatório apresentado ao IBAMA-AM, p. 25, 1999.

ARTONI, R.F, VENERE, P.C. and BERTOLLO, L.A.C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). Cytologia, v.63, p. 421-425, 1998.

ARTONI R.F., MOLINA W.F., BERTOLLO L.A.C. e GALETTI JR. P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and Leporinus elongatus (Characiformes). Genet. Mol. Biol., 22: 39-44, 1999.

ARTONI, R.F., FALCÃO, J.N., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. Chromosome Research, v.9, p. 449-456, 2001.

ARTONI, R.F., BERTOLLO, L.A.C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genis Triportheus. A monophyletic state and NOR location on the chromosome. Heredity, v.89, p. 15-19, 2002.

ASAHIDA, T., IDA, H., INOUE, S. Karyotypes of three rays in the order Myliobatiformes. Jpn. J. Ichthyol. 33, 426–430, 1987.

ASAHIDA, T. & IDA, H. Karyotypes of two Rays, Torpedo tokionis and Dasyatis matsubarai, and Their Systematic Relationships. Japanese Journal of Ichthyology, V.37, n.8. 71-75, 1990.

ASAHIDA, T., IDA, H., TERASHIMA, H., CHANG, H.Y. The karyotype and cellular DNA content of a ray, Mobula japonica. Jpn. J. Ichthyol. 40, 317–322, 1993.

BAKER WJ, HEDDERSON TA, DRANSFIELD J. Molecular phylogenetic of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetic Evolution 14*: 218-231, 2000.

BEÇAK, W.; BEÇAK, M.L. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes. Cytogenetics, 8: 247-262, 1969.

BEÇAK, W. Evolution and differentiation of sex chromosomes in lower Vertebrates. Differentiation, v.23, suppl., p. S3-S12, 1983.

BERNARDI, G. (1993). The vertebrate Genome: Isochores and Chromosomal Bands. In: Chromosomes Today, A.T. Summer and A.C. Chandle (eds). Chapman and Hall, London. Vol. 11, pp. 49-60.

BERTOLLO, L.A.C. Estudos citogenéticos no gênero Hoplias Gill, 1903 (PISCES, ERYTHRINIDAE). Tese de Doutorado, Departamento de Genética e Matemática Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 164p, 1978.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética *1*: 103-120, 1978.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (PISCES, ERYTHRINIDAE). Rev. Bras. Genet., v.2, p. 17-37, 1979.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S., MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). Cytologia, v.48, p. 1-12, 1983.

BERTOLLO, L.A.C. and CAVALLARO, Z. I. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. Cytogenet. Cell Genet., v.60, p. 60-63, 1992.

BERTOLLO, L.A.C., FONTES, M.S., FENOCCHIO, A.S. and GANG, J. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. Chromosome Res., v.5, p. 493-499, 1997.

BERTOLLO, L.A.C. and MESTRINER, C.A. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analysis. Chromosome Res., v.6, p. 141-147, 1998.

BORN, G.G. and BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. Chromosome Res., v.8, p. 111-118, 2000.

BRASIL. Portaria nº 145/98, de 29 de outubro de 1998: dispõe sobre introduções, re-introduções e transferências de espécies aquáticas no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 1998.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S. & LOPES, B.S. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Brasília, Embrapa - SPI. 184p., 1999.

BRITTO, S.G.C. Peixes do Rio Paranapanema. 1ª ed. Horizonte Geográfico, São Paulo, 2004. BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S. & LOPES, B.S. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Brasília, Embrapa - SPI. 184p., 1999.

BRUM, M.J.I., GALETTI JR., P. M. CORREA, M. M. O. and AGUILAR, C.T. Multiple sex chromosomes in South Atlantic fish, *Brevoortia aurea* (Clu-peidae). Brazil. J. Genet, v.15, p. 547-553, 1992.

BULL, J.J. Sex Determination in Reptiles. The Quarterly Review of Biology, 55 (1): 3-21, 1980.

CÂNDIDO-SILVA, A.G. Morfometria e ecologia de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2006.

CARVALHO, M. L. Avaliação do conteúdo de DNA nuclear em células de peixes Characiformes da região Neotropical. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2001.

CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.R. & ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). *In:* Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (orgs.). Check List the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs. 329-347p., 2003.

CASTELLO, H.P. & YAGOLKOWSKI, D. R. (1969). Potamotrygon castexi n. sp., una nueva especie de raya de agua dulce del rio Paraná. Acta Scientifica. ILAFIR. 21p.

CASTRO, J.; VIÑA, A.; SÁNCHES, L.; MARTINEZ, P. Caracterization of na atypical NOR site polymorfism in Brown trout (Salmo trutta) with Ag and CMA3-staining, and fluorescent in situ hybridization. Cytogenet. Call Genet, v.75, p.234-239, 1996.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C. and MOREIRA FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. Caryologia, v.54, p. 253-260, 2001.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C. and MOREIRA FILHO, O. A ZZ-ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). Caryologia, v.55, p. 139-150, 2002.

CENTOFANTE, L., PORTO, J. I. R., FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. Caryologia 55 (1): 37-45, 2002.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C., BUCKUP, P.A. and MOREIRA FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). Hereditas, v.138, p. 213-218, 2003.

CESTARI A.N. (1973). Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. In: Exercícios práticos de genética. Companhia Editora Nacional - Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 29-31.

CESTARI, M. M. (1996). Estudos citogenéticos bioquímicos em peixes do gênero *Serrasalmus* (Characiformes). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP. 232p.

CESTARI, M. M.; GALLETTI Jr., P. M. (1992a). Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguai rivers: evolution and cytotaxonomic considerations. Copeia. (1): 108-112.

CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. Science 251(4997): 1030-3, 1991.

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ROSA, R.S. & RINCÓN, G. Neotropical freswater stingrays: diversity and conservation status. Shark News, 14: 47-51, 2002.

COLE CJ, LEAVENS CR. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. Herpetology 3: 102, 1971.

COMPAGNO, L.J.V. & COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranches: status of taxa and prospects for the future. Journal of Aquariculture & Aquatic Sciences, 7: 62-90, 1995.

CRISP MD, APPELS R, SMITH FM, KEYS WMS. Phylogenetic evaluation of 5S ribosomal RNA gene and spacer in the *Callistachys* group (Fabacea: Mirbelieae). *Plant Systematics and Evolution 218*: 33-42, 1999.

CRONN RC, ZHAO X, PATERSON AH, WENDEL JF. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular Evolution 42*: 685-705, 1996.

DEVLIN R.H and NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191-364, 2002.

DIAS, A. L. and FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). Brazil. J. Genet, v.16, p. 585-600, 1993.

DONAHUE, W.H. A karyotypic study of three species of Rajiformes (Chondrichthyes, Pisces). Can. J. Genet. Cytol. 16: 203-211, 1974.

EGGERT, C. Sex determination: the amphibian models. Reprod. Nutr. Dev. 44 (6): 539-49, 2004.

EGOZCUE Y (1971) Técnicas em citogenética. Editora Espaxs, Barcelona. 144p.

EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A. & PARDUE, M. L. (1974). Localization of the genes coding for 18s and 28s ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma, 48: 405-426.

FALCÃO, J. N. Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.

FELDGERG, E., BERTOLLO, L.A.C., ALMEIDA-TOLEDO, L.F, FORESTI, F. and MOREIRA-FILHO, O. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). Genome., v.29, p. 1-4, 1987.

FELDBERG, E., PORTO, J. I. R., SANTOS, E. B. P., VALENTIM, F. C. S. (1999). Cytogenetic studies of two freshwater Scianids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the central Amazon. Genet. and mol. Biol. 22 (3): 351-356.

FERREIRA, I.A., OLIVEIRA, A. VENERE, P.C., GALETTI, P.M. E MARTINS, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus Leporinus (Characiformes: Anostomidae). Genetica 129:253-257, 2007.

FERRO, D.A.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): Population distribution and functional diversity. Genetica, v.110, p.55-62, 2001.

FISCHER, C., OZOUF-COSTAZ, C., CROLLIUS, H.R., DASILVA, C., JAILLON, O., BOUNEAU, L., BONILLO, C., WEISSENBACH, J., BERNOT, A. Karyotype and chromosomal location of characteristic tandem repeats in the pufferfish Tetraodon nigroviridis. Cytogenet Cell Genet 88: 50-55, 2000.

FORESTI F, ALMEIDA-TOLEDO LF AND TOLEDO SA – Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogen. Cell Genet. 31: 137-144, 1981.

FORESTI, F. Estudos cromossômicos em Gymnotiformes (Pisces, Ostariophysi). Tese de Livre Docência. Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, 1987.

FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., TOLEDO, S.A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). Genetica 79: 107-114, 1989.

FORESTI, F., OLIVEIRA, C. AND ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A method for chromosome preparationsfrom large fish specimens using *in vitro* short-term treatment with colchicine. Experientia 49: 810-813, 1993.

FRANCIS, R.C. & BARLOW, G.W. Social control of primary sex differentiation in the Midas Cichlid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (22): 10673-75, 1993.

GALETTI Jr., P. M. Aspectos citogenéticos da família Anostomidae (Pisces, Characiformes). Tese. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos – SP. 204p, 1984.

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

GALETTI JR., P.M., SILVA, E.B., CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev Brasil Genet 8*: 479-484, 1985.

GALETTI Jr., P.M., FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in Leporinus (Pisces, Anostomidae) and their relationships in the phylogeny of the group. Brazil. J. Genet, v.1, p. 135-140, 1987.

GALETTI Jr., P. M., CESAR, A. C. G., VENERE, P. C (1991a). Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Caryologia, 44 (3-4):287-292. GALETTI Jr., P.M., FORESTI, F. Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in Leporinus (Pisces, Anostomidae) and their relationships in the phylogeny of the group. Brazil. J. Genet, v.1, p. 135-140, 1987.

GALETTI JR. P.M. e RASCH E.M. Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei: Poeciliidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters, 4: 269-277, 1993.

GALETTI Jr., P. M., MESTRINER, C. A., VENERE, P. C., FORESTI, F. (1991b). Heterochromatin and karyotypic reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). Cytogenet. Cell Genet., 56: 116-121.

GALETTI Jr, P.M., LIMA, N. R. W. and VENERE, P.C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). Cytologia, v.60, p. 375-382, 1995.

GARCIA–PARRA, W. J. (2000). Citogenética Comparativa de Peixes da Subfamília Myleinae (Serrasalmidae, Characiformes) da Amazônia Central. Tese de Doutorado – INPA: 156p.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V.; VILELA, M.J.A.; UIEDA, V.S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. Biota Neotropica v7 (n1), 2007.

GORNUNG, E., GABRIELLI, I., CATAUDELLA, S., SOLA, L. CMA_3-banding pattern and fluorescence *in situ* hybridization with 18S rRNA genes in zebrafish chromosomes. *Chromos Res 5*: 40-46, 1997.

GORNUNG E, DE INNOCENTIIS S, ANNESI F, SOLA L. Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3. Chromosome Res 8:362-362, 2000.

GRUBER, S.H.; HAMASAKI, D. I. & DAVIS B.L. (1975). Window to the epiphysis in sharks Copeia. 378 – 380p.

GUERRA, M. Introdução à Citogenética de Geral. Ed. Guanabara, pg. 142, 1988.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, 1999.

HATANAKA & GALETTI JR. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica. 239-244, 2005.

HOFGATNER, F.J., KRONE, W., JAIN, K. Correlated inhibition of ribosomal RNA synthesis and silver staining actinomycin D. *Hum Genet 47*: 329-333, 1979.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. Copeia, v.3, p. 544-546, 1979.

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.

IDA, H., I. SATO AND N. MIYAWAKI. Karyotypes of two species in the order Torpediniformes. Jap. J. Ichthyol. 32: 107–111, 1985.

JAZEN, F.J. & PHILIPS, P.C. Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. Journaul of evolutionary biology, 19 (6): 17775-84, 2006.

JESUS C.M. Contribuições aos estudos citogenéticos da família Parodontidae (Pisces, Characiformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 1996.

JESUS C.M. and MOREIRA-FILHO, O. Karyotipes of three species of Parodon (Teleostei, Parodontidae). Ichthyol. Explor. Freshwater, v.11, p. 75-80, 2000.

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localiztion of 5S and 18S rRNA genes in Prochilodus lineatus (Characiformes, Prochilodontidae). Caryologia, v.56, p.281-287, 2003.

JOFFE BI, VALIEJO-ROMAN KM, BIRSTEIN VY, TROITSKY AV. 5S rRNA sequences of 12 species of flatworms: implications for the phylogeny of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia 305*: 37-43, 1995.

KAVALCO, K.F. e MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus Astyanax (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. Caryologia, v.56, n.4, p.453-461, 2003.

KEMP, N.E. (1999). Integumentary system and teeth. In:Hamlett, W.C. (ed.) Sharks, Skates and Rays. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 02-42p.

KLIGERMAN, A.D. & BLOOM, S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34: 266-269, 1977.

KLINKHARDT, M. B. (1998). Some aspects of karyoevolution in fishes. Animal Research and development. Volume 47.

LEE MR, ELDER FFB. Yeast simulation for bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. Cytogenet Cell Genet 26: 36-40, 1980.

LEVAN, A., FREDGA, K. and SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v.52, p. 201-220, 1964.

LONG, E.O. & DAVID, I.D. Repeated genes in eukaryotes. Ann Rev Biochem 49: 727-764, 1980.

LOWE, C.; GOODMAN-LOWE, G. (1996). Suntanning in hammerhead sharks. Nature. 383. 677p.

LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. Genome, v.36, p.762-773, 1993.

MAISTRO, EL. (1996). Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu (SP).

MAISTRO, E.L., MATA, E.P., OLIVEIRA, C. and FORESTI, F. Unusual occurrence of a ZZ-ZW Sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces. Characiformes, Characidiinae). Genetica, v.104, p. 1-7, 1998.

MAKINO, S. The chromosomes of two elasmobranch fishes. Cytologia 2: 867-876, 1937.

MANIGLIA, T.C.; BONI, T.A.; BIGNOTTO, T.S.; CARLOS, V.A.; GOMES, V.N.; LÚCIO, L.C.; MACHADO, S.A.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J. (2007). Caracterização molecular de duas espécies de raias (Chondrichthyes, Potamotrygonidar) da planície de inundação do Alto Rio Paraná. XVII Encontro Brasileiro de ictiologia – EBI 2007.

MANTOVANI, M., ABEL, L.D.S., MESTRINER, C.A., MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. Genetica, v.109, p. 161-168, 2000.

MARGARIDO V.P. e GALETTI JR. P.M. (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). Genet. Mol. Biol., 23: 569-573.

MARTINEZ, J.L.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (Anguilla anguilla). Cytogen Cell Genet., v.73; p.149-152, 1996.

MARTINS, C. & GALETTI JR., P.M. Narrow chromosome diversity in fishes of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios 92*: 139-147, 1997.

MARTINS, C., GALETTI Jr., P.M. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. Genetics and Molecular Biology, v. 21, p. 355-360, 1998.

MARTINS, C. & GALETTI, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anastomidae, Chraciformes). Chromosome Research 7: 363-367, 1999.

MARTINS C, WASKO AP, OLIVEIRA C, WRIGHT JM. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. Hereditas 133: 39-46, 2000.

MARTINS C, GALETTI PM. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome 44*: 903-910, (2001a).

MARTINS C, WASKO AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) Focus on Genome Research. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 335-363, 2004.

MAYR, B., KALAT, M., RAB, P. Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta*. *Theor Appl Genet 71*: 703-707, 1986.

MEDRANO, L.; BERNARDI, G.; COUTIRIER, J. & DUTRILLAUX, B. (1988). Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. Chromosoma 96: 178-183.

MENGDEN, G. A., AND A. D. STOCK. Chromosomal evolution in Serpentes; a comparison of G and C banding patterns of some colubrid and boid genera. Chromosoma 79:53–64.MICHELLE, J. L., TAKAHASHI, C. S. and FERRARI I. (1997). Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). Cytologia, v.42, p. 539-546, 1980.

MESSIAS LH, FERREIRA DC, WASKO AP, OLIVEIRA C, FORESTI F, MARTINS C. 5S rDNA organization in the fish Synbranchus marmoratus (Synbranchidae, Synbranchiformes). Hereditas 139:228-231, 2003.

MICHELLE, J. L., TAKAHASHI, C. S. and FERRARI I. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). Cytologia, v.42, p. 539-546, 1997.

MOLINA, W. F. (1995). Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 177p.

MOLINA, W.F. and BERTOLLO L.A.C. Cromossomos sexuais múltiplos em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae). In: XXIV Congreso Argentine de Genetica, Posadas, Misiones, Argentina, p.126, 1993.

MOLINA, W.F., SCHMID M. and GALETTI Jr., P.M. Heterochromatin and sex chromosomes in Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). Cytobios, v.94, p. 141-149, 1998.

MORÁN P, MARTÍNEZ JL, GARCIA-VÁSQUEZ E, PENDÁS AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics 75*: 145-150, 1996.

MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C., GALETTI Jr., P.M. Evidences for a multiple sex system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). Caryologia, v.33, p. 83-91, 1980.

MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C., GALETTI JR., P.M. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). Caryologia, v.46, p. 115-125, 1993.

MORESCALCHI, A. Chromosomes, sex determination and environment in teleostens. *In*: Dallai R. (Ed.) Sex Origin and Evolution. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., Modena: Mucchi, p. 137-149, 1992.

MORESCALCHI, M.A; LIGUORI, L.; ROCCO, L.; ARCHIMANDRITIS, A. & STINGO, V. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in Polypterus senegalus (Osteichthyes, Polypteridae). Genetica, 132: 179-186, 2008.

MURAKAMI M, FUJITANI H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, Carassius auratus langsdorfi). Genes Genet Syst 73:9-20, 1998.

NAKAYAMA, C. M. (1997). Caracterização Cariotípica de Peixes da Subfamília Serralminae (Characiformes) da Bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado.

Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Programa de Pós-graduação em Biologia tropical e Recursos Naturais. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Manaus, Am. 60p.

NAKAYAMA, C. M., JÉGU, M., PORTO, J. I. R., FELDBERG, E. (2001). Karyological evidence for a cryptic species of Piranhas within *Serrasaumus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. Copeia 3: 866-869.

NANDA I., FEICHTINGER, W., SCHMID M., SCHRODER J.H., ZISCHLER H. and EPPLEN J.F. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in guppy fish. J. Mol. Evol., v.30, p. 456-462, 1990.

NAVARRETE M.C. and JÚLIO Jr. H.F. Polimorfismo cromossômico e cromossomos sexuais em Curimatideos do pantanal Sul-Matogrossense (Characiformes). In: VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, p. 57. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1996.

NYGREN, A., NILSSON, B. AND JAHNKE, M. Cytological studies in *Salmo trutta* and *Salmo alpinus.* Hereditas, 67: 259-268, 1971.

OHNO, S. Sex-chromosome and sex linked genes. Springer-Verlag. New York. 192p., 1967.

OLIVEIRA C, ALMEIDA-TOLEDO LF, FORESTI F, TOLEDO FILHO SA. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Caryologia 41: 227-236, 1988a.

OLIVEIRA,C.; ALMEIDA-TOLEDO, LF.; FORESTI, F. Karyotipic Evolution in Neotropical Fishes. (Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kaapoor, B.G.). Fish cytogenetics. USA, Science Publisher, p.11-152, 2006.

OLMO, E.; STINGO, V.; COBROR, O.; CAPRIGLIONE, T. & ODIERNA, G. Repetitive DNA and polyploidy in selachians. Comp. Biochem. Physiol. B 73: 739-745, 1982.

ORR, R.T. Biologia dos vertebrados. São Paulo, Editora Roca.508 p., 1986.

OTA, K., TATENO Y, GOJOBORI T. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). Gene 317:187–193, 2003.

OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; AND WILLIAMS, R. (1996). Ribosomal RNA location in the Antarctic fish*Champsocephalus gunnari* (Notothenioidei, Channichthyidae) using banding and fluorescence*in situ* hybridization. Journal: Chromosome Research, Volume 4, Number 8: 557-561.

PASONATO, J.C. Estudos citogenéticos em espécies de *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) e ocorrência de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. Dissertação de mestrado. UNESP – Botucatu, 2006.

PASOLINI, P., COSTAGLIOLA D, ROCCO L, TINTI F. Molecular organization of 5S rDNA in Rajidae (Chondrichthyes): Structural features and evolution of piscine 5S rRNA genes and nontranscribed intergenic spacers. J Mol Evol 62:564-574, 2006.

PAULS, E. & BERTOLLO, L.A.C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica 81*: 117-123, 1990.

PENDÁS AM, MORÁN P, FREIJE JP, GARCIA-VÁSQUEZ E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics 67*: 31-36, 1994a.

PENDÁS AM, MÓRAN P, MARTÍNEZ JL, GARCIA-VÁSQUEZ E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brow trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology 4*: 275-276, 1995.

PHILLIPS, R.B. & HARTLEY, S.E. Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome 30*: 193-197, 1988.

PHILLIPS, R.B. & IHSSEN, P.E. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). Cytogenetic Cell Genet, v.39, p. 14-18, 1985.

PHILLIPS, R. B. & REED, K. M. (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. Aquaculture, 140(1996): 197-216.

PICHIRI, G.; NIEDDU, M.; MANCONI, S.; CASU, C.; CONI, P.; SALVADORI, S. And MEZZANOTTE, R. Isolation and characterization of two different 5S rDNA in Anguilla anguilla and in Anguilla rostrata: possible markers of evolutionary divergence. Molecular Ecology Notes, v.6, 638-641, 2006.

PORTO, J. I. R., FELDBERG, E., NAKAYAMA, C. M., FALCÃO, J. N. (1992). A checklist of chromosome number and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. Rev. Hidrobiol. Trop. 25 (4): 287- 299.

RÀB P., MAYR B. e ROTH P. (1991) - Chromosome banding study of European catfish, *Silurus glanis* (Pisces, Siluridae). Genética, 83: 153-157.

RAB, P. Chromosome study of four poeciliid fishes from Cuba. Folia Zool., v.33, p. 229-234, 1984.

REED, K. M. AND PHILLIPS, R. B. Molecular cytogenetic analysis of the double-CMA_3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenet Cell Genet*, 70**:** 104–107, 1995.

RICE, W.R. Evolution of the Y sex chromosome in animals. BioScience, v.46, p. 331-343, 1996.

ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; FIORILLO, M.; TINTI, F. & STINGO, V. Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, *Taenura lymma* and *Raja montagui* (Chondrichthyes, Batoidea). Genetica 123: 245–253, 2004.

ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; MARSILIO, A. & STINGO, V. Localizzazione cromosomica dei cistroni ribosomali in due Batoidea. Atti 63 Convegno UZI: 120, 2002b.

ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; COSTAGLIOLA, D. & STINGO, V. Karyotype and genome characterization in four cartilaginous fishes. Gene 295: 289-298, 2002a.

ROCCO, L.; PIZANO, E.; OZOUF COSTAZ, C.; FOSRETI, F. & KAPOOR, B. Fish Cytogenetycs. Editora Science Publishers, England, 2006.

ROCCO, L.; STINGO, V. & BELLITI, M. (1996). Cloning and characterization of a repetitive DNA detected by HinIII in the genome of *Raja montagui* (Batoidea, Chondrichthyes). Gene 176: 185-189.

ROCHA, G. T. (1987). Estudos do complemento cromossômico e da região organizadora de nucléolos em algumas espécies de aves. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Botucatu – São Paulo.

ROSA, R.S. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes:Portamotrygonidae). PhD thesis. The College of William and Mary, Williamsburg. 523p, 1985.

ROSA, R.S., Carvalho, M.R., and Wanderley, C.A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. Neotropical Ichthyology, 6(1):1-8, 2008.

SAJDAK SL, REED KM, PHILLIPS RB. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *Journal of Molecular Evolution 46*: 680-688, 1998.

SANCHEZ, S., and JORGE, L.C. A new report of the ZZ/ZW sex chromosome system in the genus Triportheus (Pisces, Triportheinae). Cytologia*,* v.64, p. 395-400, 1999.

SATO, E.R. and MARTINS-SANTOS, I.C. Análise citogenética em *Odontostilbe* cf. *microcephala* (Pisces, Cheirodontinae) do Rio Paraná. In: 45°Congresso Nacional de Genética, Gramado, RS, Brazil, p. 81, 1999.

SCAVONE, M.D. and JULIO Jr. H.F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribuition in ZZ/ZW sex chromosome of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon (*Loricariidae, Siluriformes), Brazil. J. Genet., v.18, p. 31-35, 1995.

SCHARLT, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. Current Opinion in Genetics and development, 14 (6): 634-41, 2004.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiates ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). Chromosoma, v.80, p. 69-96, 1980.

SCHMID, M., OLERT, J., KLETT, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma, v.71, p. 29-55, 1979.

SCHMID, M.; VITELLI, L. & BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma 95: 271-284, 1987.

SCHMID, M. & GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma 97*: 101-114, 1988.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma, Berlim, v.58, p.307-324, 1976.

SCHWARTZ, F.J., MADDOCK, M.B. Comparisons of karyotypes and cellular DNA contents within and between major lines of elasmobranch. In: Uyeno, T., Arai, R., Tuniuchi, T., Matsuura, K. (Eds.), Indo-Pacific Fish Biology Ichthyological. Society Japan, Tokyo, p. 148, 1986.

SILVESTRO, M. and MARGARIDO, V.P. Sistema de cromossomos sexuais X1X1X2X2/X1X2Y em *Erythrinus erythrinus* (Pisces, Erythrinidae) do alto Paraná, com a descrição de cromossomos supranumerários restritos ao sexo feminino. *In:* 47° Congresso Nacional de Genetica. Águas de Lindóia. SP, Brazil, 2001.

SOLA, L., MONACO, P.J., RASCH, E.M. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NORs polymorphisms and sex-chromosomes in three populations of *Poecilia latipina*. Cytogenet Cell Genet 53: 148-154, 1990.

SOLA, L., ROSSI, A.R., IASELLI, V., RASCH, E.M., MONACO, P.J. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding,

DAPI, quinacrine, chromomycin A_3 and silver staining. Cytogenet Cell Genet 60: p.229-235, 1992.

SOUZA, I.A.(2000). Geografia física do Rio Paraná, Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto de Geociências da Universidade Estadual de Londrina.

SOUZA I.L., MOREIRA-FILHO O. e GALETTI JR. P.M. (1996). Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. Bras. J. Genet., 19: p. 405-410.

STINGO, V. New developments in vertebrate citotaxonomy. II. The chromosomes of the cartilaginous fishes. Genetica 50, 227–239, 1979.

STINGO, V., CAPRIGLIONE, T. DNA and chromosomal evolution in cartilaginous fish. In: Ueno, T., Arai, R., Taniuchi, T., Matsuura, K. (Eds.), Indo-Pacific Fish Biology. Ichthyological Society Japan, Tokyo, pp. 140–147, 1986.

STINGO, V. & ROCCO, L. Selachian cytogenetics: a review. Genetica 111: p. 329-347, 2001.

STINGO, V.; ROCCO, L.; & IMPROTA, R. (1989). Chromosome markers and a karyology of Selachians. J. Exp. Zool. Suppl. 2: p.175-185.

STINGO, V.; ROCCO, L.; ODIERNA, G. & BELLITI, M. NOR and heterochromatin analysis in two cartilaginous fishes by C-Ag- and RE (restriction endonuclease)-bading. Cytogenet. Cell. Genet. 71: p.228-234, 1995.

STORER, T.; USINGER, R.L; STEBBINS, R.C. & NIBAKKEN, J.W. Zoologia Geral. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 6ª edição. p.816, 1991.

SMITH, W.S. & MARCIANO, F.T. A ictiofauna da Floresta de Ipanema – Iperó, São Paulo, Brasil, como base para adoções de manejo, conservação e educação ambiental. II Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação: p. 409-417, 2000.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: p. 304-306, 1972.

SUZUKI H, MORIWAKI K, SAKURAI S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. *Molecular Biology Evolution* 11: 704-710, 1994.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat DNAr spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. Cytogenet. Cell Genet, v. 72, p.1-4, 1996.

SWARÇA, A.C., FENOCCHIO, A.S., CESTARI, M.M., DIAS, A.L. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two species (Pimelodidae, Siluriformes). Genetica, v.119, p. 87-92, 2003.

THORSON, T.B.; WOOTON, R. M. & GEORGI, T.D. Rectal gland of freshwater stingrays, Potamotrygon spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), 1978.

UDOVICIC F, MCFADDEN GL, LADIGES PY. Phylogeny of *Eucaliptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogeny and Evolution 4*: 247-256, 1995.

UYENO, T. and MILLER, R.R. Multiple sex chromosomes in mexican cyprinodontid fish. Nature, v.231, p. 452-453, 1971.

UYENO T. and MILLER R.R. Second discovery of multiple sex chromosome among fishes. Experientia, v.28, p. 223-225, 1972.

VALENTIM. F.C.S. Caracterização cromossômica em espécies de peixes da família Potamotrygonidae (CHONDRICHTHYES, RAJIFORMES) do Médio Rio Negro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2001.

VALLENDER, E.J. & LAHN, B.T. Multiple independent origins of sex chromosomes in amniotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (48): 18031-2, 2006.

VALENTIM, F.C.S.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. Chromosomes of three freshwater stingrays (Rajiformes, Potamotrygonidae) from the Rio negro basin, Amazon, Brazil. Genetica, 128: p.33–39, 2006.

VENERE, P.C. & GALETTI, JR P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. Revista Brasileira de Genética 12: p.17-25, 1989.

VENERE, P.C., and GALETTI Jr. P.M. Cromossomos sexuais em *Opsodoras* sp. (Siluriformes, Doradidae) do médio rio Araguaia. In: VII Simpósio de

Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, Londrina, PR, p. 10, 1998.

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

VERMULM, H. J.; DUARTE-GIAMAS. M.T. (2006). Algumas considerações sobre a ictiofauna do alto rio Paraná.

VICENTE, V.E. Estudos citogenéticos e moleculares em Parodon hilarii e correlações com outras espécies da família Parodontidae (Pisces, Characiformes). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil, 96p, 2001.

VILELA, M.J.A., FRANCO, R.A.M. & ALMEIDA, N.V.A. Monitoramento da pesca no reservatório de Porto Primavera (UHE Engº Sérgio Motta), no Rio Paraná. Relatório Final (Agosto/2000-Novembro/2003), CESP/FAPEC/UFMS, Três Lagoas, 2004.

VISCONTI, M.A.; RAMANZINI, G.C.; CAMARGO, C.R. & CASTRUCCI, A.M.L. (1999). Elasmobranchii color change: A short review and novel data on hormone regulation. J. Exp. Zool. 284: p.485-491.

VISSOTTO, P.C., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). Chromosome Science, v.3, p. 9-13, 1999.

VIÑAS A, GÓMEZ C, MARTÍNEZ P, SÁNCHEZ L. Localization of rDNA genes in European eel (*Anguilla anguilla*) by FISH. *Genome 39*: 1220-1223, 1996.

VOLFF, J.N. Genome evlution and biodiversity in Teleost fish. Heredity 94 (3): 280-94, 2005.

XIA, X., XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J. Heredity 92:371-373, 2001.

WASKO, A.P. & GALETTI JR., P.M. Extensive NOR variability in fishes of the genus *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). Cytologia 64:p. 63-67, 1999.

WASKO AP AND GALETTI JR PM. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Genetics and Molecular Biology 23: 135-138, 2000.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M.; GALETTI, P.M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome 44*: p.893-902.

WILSON, J.F. & DOOD, J.M. 1973. The role of the pineal complex and lateral eyes in the colour change response of the dogfish. J. Endocrinol. 58: p.303-312.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press Inc., San Diego, p.315-322.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.