



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



NATÁLIA MACHADO DOS SANTOS

**Mapeamento gênico de sítios repetitivos de
DNAr 5S e 18S em *Astyanax scabripinnis*
(Characiformes, Characidae).**

BOTUCATU-SP
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU



NATÁLIA MACHADO DOS SANTOS

**Mapeamento gênico de sítios repetitivos de
DNAr 5S e 18S em *Astyanax scabripinnis*
(Characiformes, Characidae).**

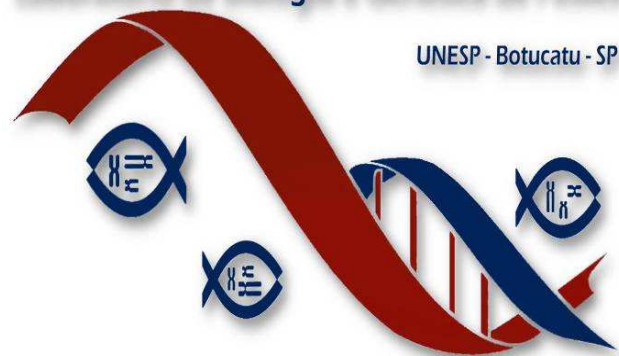
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Ciências Biológicas
(Zoologia) do instituto de Biociências de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

BOTUCATU-SP
2010

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



...dedico esse trabalho aos meus queridos pais que sempre se dedicaram me incentivando e me apoiando...a minha irmã Vanessa Cassoní, que está sempre presente em todos os momentos da minha vida. E também a meu amado marido, por ter alcançado mais essa etapa comigo...

“...è melhor atirar-se a luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo o que é estático, como os pobres de espíritos que não lutam, mas também não vencem, que não conhece a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros, esses pobres de espíritos, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus, por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida.”

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus agradecimentos a todos que de algum modo contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho e de modo especial:

Primeiramente a Deus, que sempre esteve, está e estará presente ao meu lado em todos os momentos. **“A terra repleta de céu, e cada arbusto comum incendiado com Deus, mas só aquele que vê tira os sapatos; os outros se sentam ao redor e colhem amoras”**. (Elizabeth Barrett Browning)

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por abrir tantas portas a minha frente, por acreditar em mim me dando oportunidades e principalmente pelo exemplo de humildade que sempre representou na minha vida. **“O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto, a sabedoria é humilde por não saber mais”**. (William Cowper)

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos. **“A maior habilidade de um líder é desenvolver habilidades extraordinárias em pessoas comuns”**. (Abraham Lincoln)

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelos ensinamentos, disponibilidade e auxílio na realização da técnica de hibridação *in situ*.

Ao técnico de laboratório de Biologia e Genética de Peixes, amigo e companheiro Renato Devidé, pela amizade, conselhos, palavras, descontração e essencial auxílios nas preparações cromossômicas, minhas metáfases não seriam as mesmas sem você. Vou sentir saudades... **“A fé nunca sabe onde está sendo levada, mas conhece e ama aquele que a está levando”**. (Oswald Chambers)

Aos amigos e colegas de trabalho Cristiane e Marlon, pelo grande apoio e disposição no auxílio com algumas técnicas usadas nesse trabalho. **“Nunca é perdido o tempo dedicado ao trabalho”**. (Ralph Waldo Emerson)

Ao amigo de laboratório Zeca, pelas inúmeras vezes que me ajudou com o complicado Photoshop, além dos momentos de descontração e amizade ! Muito obrigada mesmo!!! **“A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens”**. (François La Rochefoucauld)

A todos os colegas e companheiros do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Alex, Aline, Andréia Alves, Bruno (Guiodai), Bruno de Melo, Claudinha, Celso, Daniela, Débora. Elisa, Emanuel, Fábio (Fio), Fernando (Konrado), Glaucia, Gleisy, Guilherme (Varvito), Guilherme Lopes, Luis (Ziriguidum), Mahmoud, Maressa,

Patrícia, Ricardo Paiva, Ricardo Britski, Tatiane, Vitor, Vivi, Waldo, obrigada por todo o auxílio, por todos os churrascos, risadas e momentos que passamos juntos. **“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.** (Fernando Pessoa)

A família Lyra, Paulo “Roberto”, Tutu e Adriana que são grandes e eterno amigos que quero preservar até a minha velhice chegar!!! Muito obrigada por todo o carinho, todos os churrascos, todas as conversas!!!! E aos meus grandes amigos, que me dão suporte, alegria e muitas muitas risadas, Amanda Blasi, Flavinha, Gustavo Pescatori, Gustavo Valim, Isa, Japinha, Juliana Marino, Juliana Simon, Jefferson, Kelly, Mari, Maurício Branco, Natália Brisiguelo, Priscila “India”, Pitera, Rafinha, Ricardo (Japa), Serginho, Silvinha. Pessoas mais que preservo e amo demais, costumo falar que são presentes que Deus colocou no meu caminho. **“A amizade nem mesmo a força do tempo irá destruir, somos verdade...quero chorar o teu choro, quero sorrir teu sorriso, valeu por você existir...AMIGO”.** (César Augusto)

Às minhas lindas e queridas, Juzinha, Magrela e Priscila, a casa de vocês sempre foi o refúgio dos meus melhores momentos e das maiores crises de risadas, nem sei como vou viver sem isso...mas todos esses momentos estarão pra sempre guardados no meu coração! Amo vocês! **“As lembranças constroem um caminho que chega até o coração e faz com que os amigos sempre se sintam perto, mesmo que em realidade estejam muito longe um do outro”.**

A grande amiga Lessandra De Rosa pelo auxílio, disposição, amizade, risadas, confissões e discussões que contribuíram muito para o meu trabalho e para a minha vida pessoal, muito obrigada por tudo! Agradeço também à Vanessa Paes por toda a ajuda, conselhos e amizade; quero estar ao seu lado, em cada etapa e em cada vitória da sua vida!! Obrigada pela paciência e dedicação nesse último mês... **“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.** (Charles Chaplin)

Às minhas amigas “irmãs” de graduação, Beatriz, Fernanda, Graziela, Paula e Priscila que desejo tê-las presente pelo resto da minha vida. **“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos”.** (Fernando Pessoa)

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia em especial à Luciana, Prof. Edmir, Profa. Daniela, D. Tera, D. Yolanda, Ricardo Teixeira, José Eduardo (Zé) e Vanda cujo o apoio e a disposição foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A minha irmã Sabrina Cassoni (*in memoriam*) que esteja onde estiver tenho a certeza que está torcendo por mim e por minhas vitórias; jogando flores pelo caminho que escolhi seguir. **”Só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você”.** (Teatro Mágico)

À minha irmã e minha melhor amiga, Vanessa Cassoni, por tudo que você é e me faz ser, por todo o incentivo, amor, compreensão que só quem ama assim pode entender. E também ao meu querido e amado cunhado Fábio que sempre esteve presente nos melhores e piores momentos da minha vida. **“Por ser exato o amor não cabe em si, por ser encantado o amor revela-se...por ser amor, invade e FIM!”.** (Djavan)

Ao meu pai Lalécio que sempre me incentivou nos estudos, tornando possível esse momento e a minha mãe Sueli que é uma grande amiga, dedicada a me guiar e a me apoiar em todas as minha decisões. Obrigada!! **“Ainda que eu falasse a língua dos homens, e falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria”.** (Renato Russo)

Ao meu marido e melhor amigo, companheiro de todas as horas Reginaldo (Negão) que sem seu apoio e motivação eu nada seria. Obrigada por tornar meus dias mais coloridos e divertidos, por me fazer rir nas horas mais difíceis e, assim, fazendo com que elas se tornassem mais fáceis! E, acima de tudo, obrigada pela “paciência” e amor (pois se não houvesse amor, a paciência não duraria..rs) !!! **“E hoje eu te amo, não vou negar...que outra pessoa não servirá, tem que ser você sem por que, sem pra que...tem que ser você...sem ser necessário entender”.** (Victor Chaves)

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

A família Characidae de peixes actinoptérgeos, pertencentes à ordem Characiformes, constitui o maior grupo de peixes de água doce da região Neotropical. São peixes pequenos, coloridos, geralmente providos de nadadeira adiposa, nadadeira caudal bifurcada e nadadeira anal desenvolvida, e vivem em diferentes ambientes. Os peixes da família Characidae apresentam uma grande diversidade morfológica e cariotípica, despertando, assim, grande interesse para pesquisa. Nos componentes deste grupo foi constatada a presença de cromossomos supranumerários, que têm sido registrados em um número relevante de espécies, principalmente em *Astyanax scabripinnis*. No presente trabalho foi realizada a análise citogenética em representantes de cinco populações de *Astyanax scabripinnis* que ocorrem em rios das bacias do Tietê e Paranapanema, região de Botucatu, SP. Para tanto, foram caracterizados seus cariótipos através de coloração convencional com Giemsa, a qual evidenciou um conjunto padrão de $2n=50$ cromossomos; foram identificados os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva (Banda C), que revelaram a presença de blocos centroméricos e teloméricos nos cromossomos; foram identificadas as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) através de impregnação com nitrato de Prata, evidenciando-se a presença de RONs simples e múltiplas nas diferentes populações. A análise citogenética molecular realizada permitiu a identificação das regiões cromossômicas ricas em GC com o uso da coloração pelo fluorocromo Cromomicina (CMA_3), que mostraram correspondência com as marcações identificadas pela técnica da Ag-RONs, apresentando-se também nas formas simples e múltipla; foram também identificados os cístrons ribossômicos através de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 18S, que revelou de quatro a seis marcações e com a sonda de DNAr 5S, que revelou duas marcações apenas. A microdissecção do cromossomo B e a produção de sondas totais específicas para este componente genômico revelou pela hibridação *in situ*, afinidade da sonda apenas com o próprio cromossomo B. Os dados obtidos, além de revelarem aspectos citogenéticos desta espécie, constituem informações de interesse em estudos evolutivos neste grupo de organismos, na interpretação da estrutura genética das espécies de *Astyanax* e ainda por fornecerem subsídios a futuros estudos que visem a compreensão das relações dos processos determinantes da diversificação cromossômica.

Palavras-chave: técnicas citogenéticas, double Fish, cromossomo B, microdissecção

Abstract

The family Characidae belonging to the order Characiformes, is the largest group of freshwater fishes in South America. Fish species are generally small, colorful, usually provided with an adipose fin, forked caudal fin and anal fin developed, and live in different environments. The fish of this family are very diverse morphologically and in karyotype structure, leading to a great research interest. The presence of supernumerary chromosomes have been characterized in representatives of this group, which have been identified in a relevant number of species, mainly in *Astyanax scabripinnis*. In the present study cytogenetic analysis was performed in representatives of five populations of *A. scabripinnis* found in river of the Paranapanema and Tietê river systems, in the Botucatu, SP region. Therefore, their karyotypes were characterized by conventional Giemsa staining, which showed a standard set of $2n = 50$ chromosomes. The use of C-banding technique permitted to identify the patterns of distribution of constitutive heterochromatin, which revealed the presence of blocks in the centromeric and telomeric regions of chromosomes. The nucleolar organizing regions (NORs) were identified by impregnation with silver nitrate, indicating the presence of single and multiple NORs in individuals of different populations. A molecular cytogenetic analysis performed enabled the identification of GC rich chromosomal regions with the fluorochrome Chromomycin (CMA3), which showed correspondence with the markings identified by the technique of Ag-NORs, appearing also as simple and multiple sites. The ribosomal cistrons were also identified by fluorescent in situ hybridization (FISH) with 18S rDNA probe, and showed four to six markers in the chromosomes; the probe for the 5S rDNA gene revealed only two marks in all samples analyzed. The use of the chromosome microdissection technique produced a specific total chromosome probe for the B chromosome in this species which revealed affinity only with their own chromosome B. The data obtained in the present work provide informations on the genetic structure of *Astyanax* species, reveal cytogenetic aspects for the understanding evolutionary aspects in this group of organisms, and also for provide subsidies to future studies aiming to understanding the processes which determine chromosomal diversification.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Considerações sobre os Characiformes	02
1.2 Estudos citogenéticos em peixes.....	04
1.3 Estudos citogenéticos na família Characidae.....	06
1.4 A espécie <i>Astyanax scabripinnis</i>	07
1.5 Estudos citogenéticos na espécie <i>Astyanax scabripinnis</i>	08
1.6 Mapeamento genômico	14
1.7 Mapeamento cromossômico e sequências repetitivas de DNA	15
1.8 Estudos e evolução dos cromossomos supranumerários	18
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL.....	22
4 MÉTODOS.....	26
4.1 Estimulação de Mitoses	26
4.2.Preparações de cromossomos mitóticos.....	26
4.3 Coloração com Giemsa	27
4.4 Detecção de heterocromatina constitutiva (banda C)	28
4.5 Localização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs)	28
4.6 Bandamento com o fluorocromo base-específico Cromomicina A ₃ (CMA ₃)	29
4.7 Microdissecção cromossômica	30
4.7.1 Preparo das microagulhas	30
4.7.2 Processamento da microdissecção cromossômica	30
4.7.3 Obtenção de sondas a partir de cromossomos microdissectados - DOP-PCR.....	31

4.7.3.1 Primeira PCR	31
4.7.3.2 Segunda PCR	32
4.7.3.3 PCR de marcação	33
4.7.4 Precipitação de sonda	33
4.7.5 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	34
4.7.5.1 Marcação da sonda.....	34
4.7.5.2 Preparação das lâminas	36
4.7.5.3 Hibridação e detecção dos sinais correspondentes	36
4.8 Análises cromossômicas	38
4.9 Montagem dos cariótipos	38
5 RESULTADOS	39
5.1 CAPÍTULO I -ESTUDOS CITOGENÉTICOS CLÁSSICOS EM <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), EM COMPONENTES DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS TIETÊ E PARANAPANEMA, SP.	40
5.2 CAPÍTULO II - MAPEAMENTO GÊNICO DE SÍTIOS REPETITIVOS DE DNAr 5S E 18S EM <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)	70
5.3 CAPÍTULO III - IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO DE <i>Astyanax scabripinnis</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) POR SONDA CROMOSSÔMICA OBTIDA POR MICRODISSECÇÃO	81
6 DISCUSSÃO GERAL	92
7 CONCLUSÕES	98
8 REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna Neotropical de água doce é uma das mais ricas e diversificadas do mundo. Segundo Vari e Malabarba (1998), aproximadamente 24% da diversidade mundial de peixes pode estar representada por peixes continentais da América do Sul. Estimativas apontam que existem cerca de 8000 espécies de peixes neotropicais de água doce encontradas nas Américas Central e do Sul (Schaefer, 1998). Reis *et al.* (2003), descreve 71 famílias e 4.475 espécie de peixes neotropicais nas Américas. Outros estudos relacionam aproximadamente 2.240 espécies de peixes de água doce para o Brasil (Abilhoa & Duboc, 2004). Porém, pesquisas mais recentes confirmam que a fauna de peixes continentais do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies e existindo ainda muitas em fase de descrição ou desconhecidas (Buckup *et al.*, 2007).

A maior parte desta diversidade de peixes pertence a um dos cinco grupos dominantes: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Ciclídeos (Lunberg *et al.*, 2000). Os Characiformes constituem um grupo dominante entre os peixes de água continental da América do Sul, compreendendo formas herbívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas (Britski *et al.*, 1972).

Apesar desta grande diversidade de espécies encontradas, muitas correm risco de extinção e podem desaparecer sem ao menos terem sido estudadas. Nesse cenário, a destruição de habitats, bem como a introdução de espécies exóticas, figuram como alguns dos principais fatores na diminuição da diversidade dos ambientes aquáticos da região Neotropical (Sunaga & Verani, 1991; Orsi & Agostinho, 1999; Bojsen & Barriga, 2002; Latini & Petrene Jr, 2004).

1.1 Considerações sobre os Characiformes

Dentro da ordem Characiformes está inserida a família Characidae, que é a maior e mais complexa entre as famílias desta ordem. Para se saber o número de gêneros e espécies dentro da família Characidae da ordem Characiformes, estudos foram realizados por alguns autores, dentre eles Nelson (1994, 2006) e Reis *et al.*, 2003. Embora os estudos realizados por Nelson (2006) sejam mais recentes, a referência mais comumente utilizada relaciona-se aos estudos realizados por Reis *et al.*, 2003, que relata aproximadamente 237 gêneros e 1373 espécies para Characiformes e 184 gêneros e 950 espécies para Characidae. Contudo, a taxonomia da família Characidae ainda se apresenta confusa devido à dificuldade de se estabelecer com clareza suas relações de origem, diferentemente do que ocorre com outros Characiformes como os Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae e Chilodontidae (Vari, 1983).

Os representantes da família Characidae estão presentes em diversos ambientes de água doce e distribuem-se no continente americano desde a fronteira do México com os Estados Unidos até o sul da Argentina e também no continente Africano (Lucena, 1993; Froese & Pauly, 2005).

De acordo com Fink & Fink (1981), a posição taxonômica da família Characidae é a seguinte:

CLASSE: Osteichthyes

SUPERORDEM: Ostariophysi

SUBCLASSE: Actinopterygii

ORDEM: Characiformes

INFRACLASSE: Teleostei

FAMÍLIA: Characidae

Os peixes mais comuns da família Characidae são os lambaris, piracanjubas, peixes-cachorros, pacus, piranhas e dourados, sendo que todos os representantes dessa família possuem escamas e são muito conhecidos pelos pescadores. Apresentam

variados tamanhos, desde dois centímetros como as pequiras, até mais de um metro, como os dourados (Britski, 1972).

Além disso, são facilmente encontrados por existirem em habitats diversificados e por terem uma ampla distribuição geográfica. Entretanto, as espécies de *Astyanax* são de difícil identificação devido à similaridade morfológica existente entre elas. Os representantes desse gênero possuem linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries e escamas de tamanho normal cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal. No Brasil, as espécies de *Astyanax* são popularmente denominadas como lambaris e piabas (Britski *et al.*, 1988).

A subfamília Tetragonopterinae, outrora considerada como a subfamília mais bem sucedida entre os Characidae, estando presente em quase todos os ambientes neotropicais (Géry, 1977), não pode ser reconhecida como monofilética, assim como muitos de seus mais especiosos gêneros (Weitzman e Malabarba, 1998, Malabarba e Weitzman, 2003). Recentemente, os Tetragonopterinae sofreram uma reestruturação, sendo a quase totalidade de seus gêneros considerada *Incertae Sedis* em Characidae e somente *Tetragonopterus* foi considerado válido para a subfamília (Reis, 2003). Desta forma, o gênero *Astyanax*, com cerca de 86 espécies, anteriormente alocado em Tetragonopterinae, encontra-se como *Incertae Sedis* em Characidae (Reis *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003).

Análises citogenéticas em *Astyanax* mostram uma variação de $2n=36$ em *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983^a, b) a $2n=50$ na maioria das espécies analisadas (Jin e Toledo, 1975, entre outros). Um aspecto interessante nesse gênero é a possibilidade de ocorrência de diferentes números diplóides entre indivíduos considerados como sendo da mesma espécie, capturados em diferentes bacias hidrográficas (Morelli *et al.*, 1983;

Paganelli & Moreira-Filho, 1986; Moreira-Filho & Bertollo, 1986), ao lado de outras espécies onde a constância desse número é bem característica (Paganelli *et al.*, 1986).

1.2 Estudos Citogenéticos em Peixes

Até o final dos anos 70, pouco se conhecia sobre as características citogenéticas da ictiofauna neotropical. Os dados disponíveis limitavam-se ao conhecimento do número cromossômico de algumas poucas espécies, muitas das quais obtidas de espécimes de origem geográfica desconhecida (Toledo-Filho *et al.*, 1978).

Os primeiros trabalhos publicados sobre citogenética de peixes Neotropicais foram realizados na década de 70 e, atualmente, vários outros têm sido desenvolvidos com uma ampla abrangência dos grupos de peixes, resultando em uma considerável quantidade de conhecimento disponível, segundo revisão feita por Oliveira *et al.* (2006).

Segundo Porto-Foresti *et al.* (2006), até recentemente os estudos cromossômicos nos peixes eram considerados principalmente como uma ferramenta para estudos básicos e evolutivos, não sendo utilizados no manejo e monitoramento de estoques. Quando análises citogenéticas convencionais não são suficientes para caracterizar precisamente os indivíduos, a identificação pode ser baseada em marcadores cromossômicos moleculares. Entre as técnicas citogenéticas mais utilizadas em peixes, têm-se a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) através do nitrato de Prata, a caracterização dos padrões de heterocromatina constitutiva pela técnica de bandas C, a coloração por fluorocromos base-específicos e a localização de sequências específicas com o uso sondas específicas, pela técnica da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Ocalewicz *et al.*, 2006; Porto-Foresti *et al.*, 2006).

Tanto do ponto de vista citogenético, quanto também do ponto de vista evolutivo, os peixes compõem um interessante grupo de estudo. Em termos cariotípicos, diferentes particularidades já foram relatadas nos representantes deste grupo, o que justifica o aumento nas pesquisas envolvendo estes animais (Affonso, 2000). Diferentemente de outros vertebrados, os peixes encontram-se confinados ao ambiente aquático, apresentando maiores restrições quanto à sua dispersão. No caso de peixes de água doce, seu confinamento aos sistemas hidrológicos resulta em um estreito relacionamento entre as histórias natural-evolutivas destes animais (Kavalco & Moreira-Filho, 2003).

A citogenética tem gerado resultados importantes na compreensão das relações de parentesco entre ou dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros de peixes, havendo registro de um grande número de variações cromossômicas que significam, em parte, a adaptabilidade das espécies aos diferentes ambientes. Os peixes Neotropicais apresentam uma grande variabilidade cariotípica, tanto inter quanto intra-específica, sendo que os números cromossômicos diplóides das espécies pode variar de $2n=20$ em *Pterolebias longipinnis* até $2n=132$ em *Corydoras aeneus* (Oliveira *et al.*, 1988). No grupo dos Erythrinidae, por exemplo, em *Hoplerythrinus unitaeniarus*, foi constatada a presença de 4 citótipos diferentes em uma mesma população do rio Negro (AM) onde, além da diferenças no número e na morfologia dos cromossomos, foram verificadas também diferenças no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (Giuliano-Caetano & Bertollo, 1988). Outros grupos como Characidae, Callichthyidae e Synbranchidae, entre outros, também apresentam vários exemplos dessa diversidade cromossômica (Oliveira *et al.*, 1988). Em contrapartida, alguns grupos apresentam-se extremamente conservativos em relação ao número cromossômico e à fórmula cariotípica, como pode ser verificado entre os representantes da família Anostomidae (Galetti Jr. *Et al.*, 1981),

da família Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1985) e da família Prochilodontidae (Pauls, 1985). Essas características de variabilidade ou de conservantismo do cariótipo têm sido relacionados com a estrutura das populações (Oliveira *et al.*, 1988).

Os estudos citogenéticos podem ser de extrema importância na identificação de novas espécies ou de espécies taxonomicamente problemáticas (Weitzman & Fink, 1983; Bertollo *et al.*, 1986), como parece ocorrer dentro da família Characidae, além de resultarem em informações de interesse também para o entendimento de problemas genéticos, evolutivos e sistemáticos neste grupo (Ojima, 1983).

1.3 Estudos citogenéticos na família Characidae

O trabalho de Post (1965) deu início aos estudos citogenéticos na família Characidae, no qual foi relatado o número cromossômico haplóide e/ou diplóide para várias espécies. Segundo Falcão (1988), existe uma grande amplitude numérica cromossômica entre os representantes das subfamílias de Characidae, cujos números haplóides e/ou diplóides já eram conhecidos, evidenciando uma grande diversidade cromossômica. De acordo com Cestari (1996), existe uma acentuada predominância de números diplóide entre 48 e 52 cromossomos (83,7%) em Characidae, seguidos dos números entre 54 e 64 (10,2%) e depois, entre 28 e 46 (5,9%). O número diplóide varia de 22 a 26 em algumas espécies de peixes Antárticos (Ozouf-Costaz *et al.*, 1997) até cerca de 250 em esturjões (Ascipenceridae) (Fontana *et al.*, 2001). Para a maioria das espécies, entretanto, varia de 44 a 60 (Oliveira *et al.*, 2000).

De acordo com Scheel (1973), a estrutura cariotípica dos componentes da família Characidae pode ser caracterizada por apresentar dois grandes cromossomos metacêntricos, que correspondem ao primeiro par do complemento A, sendo esta

característica compartilhada por grande parte dos integrantes deste grupo. A partir deste trabalho, a constatação foi corroborada por diferentes autores como Salvador & Moreira-Filho (1992), Maistro *et al.* (1992), Margarido & Galetti (1996) e Vicente *et al.*, (1996), entre outros. Entretanto, as análises cariotípicas em caracídeos têm revelado uma grande variabilidade cromossômica inter e intraespecífica em decorrência de polimorfismos cromossômicos estruturais e numéricos, poliploidia e diferentes tipos de heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo (Carvalho, 2000), além da eventual presença de cromossomos supranumerários (Souza, & Moreira-Filho, 1995).

1.4 A espécie *Astyanax scabripinnis*

Considerada componente de um complexo de espécie denominado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) de “complexo *scabripinnis*”, a espécie *Astyanax scabripinnis* apresenta grande diversidade morfológica e cariotípica. Estudos realizados por Mizoguchi & Martins-Santos (1998) em quatro populações com ocorrência na bacia do rio Paraná e por Maistro *et al.* (1998) em nove populações das sub-bacias dos rios Paranapanema, Pardo e Tietê, permitiram caracterizar as diferentes populações através de análises citogenéticas e morfométricas, reforçando a hipótese da existência do “complexo *scabripinnis*”. Considerando suas características biológicas associadas a dados morfológicos, esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo atualmente um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna Neotropical.

Diferentemente das outras espécies do gênero, os representantes de *A. scabripinnis* são peixes que vivem confinados especificamente às regiões da cabeceira de pequenos tributários (Britski, 1972). Estudos realizados por Melo (2000) demonstram que espécies

de cabeceira são especialistas nestes ambientes e dificilmente sobreviveriam em outros. Assim, são formadas populações pequenas e isoladas umas das outras, o que provavelmente determina a plasticidade fenotípica detectada em exemplares provenientes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Neste caso, as diferenciações morfológicas não puderam ser atribuídas ao efeito do divisor de águas, uma vez que foram observadas em indivíduos de uma mesma bacia (Caramaschi, 1986). Entretanto, Moreira-Filho & Bertollo (1991) ressaltaram que a diversidade morfológica e cromossômica verificada neste grupo, deve ser interpretada primeiramente em função das características de cada micro-bacia em particular, antes de uma análise comparativa entre sistemas mais amplos de drenagem. Exemplares de *A. scabripinnis* podem ser encontrados em trechos de baixa correnteza, principalmente em áreas sombreadas de riachos de pouca profundidade com presença de areia e pedras e onde há vegetação marginal (Caramaschi, 1986).

Em relação aos hábitos alimentares, os representantes desse grupo de espécies podem ser onívoros, insetívoros e fitoplanctófagos (Castro & Casatti, 1997). Segundo Bayley & Li (1992), os peixes típicos de ambientes de cabeceira são de pequeno porte, com alta taxa intrínseca de crescimento, apresentam ciclo de vida relativamente curto e uma ótima relação entre o comprimento do corpo e a profundidade do riacho.

1.5 Estudos citogenéticos na espécie *Astyanax scabripinnis*

Os estudos citogenéticos em Characidae têm aumentado de modo considerável nas últimas décadas, principalmente aqueles referentes aos componentes do gênero *Astyanax*. A variedade cromossômica encontrada nas espécies desse gênero reflete suas características genéticas e ecológicas.

Os primeiros estudos citogenéticos em exemplares de *A. scabripinnis* foram realizados por Moreira-Filho *et al.* (1978), em representantes de uma população existente no ribeirão do Bicudos (Brotas/SP), que apresentaram um número diplóide de $2n=50$ cromossomos. Análises cariotípicas posteriores realizadas em indivíduos de populações de diferentes bacias hidrográficas e dentro de uma mesma bacia, revelaram números cromossômicos distintos, tais como $2n=46$, 48 e 50, sendo este último o mais freqüente (Moreira-Filho, 1989; Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Além da diversidade encontrada na forma e tamanho dos cromossomos, também foram caracterizadas diferenças nos padrões de distribuição da heterocromatina e das RONS entre as populações analisadas. Os dados citogenéticos, associados aos dados morfológicos, possibilitaram a esses autores a separação de seis diferentes populações pertencentes às bacias dos rios Paranapanema, São Francisco e Tietê.

Trabalhos semelhantes realizados por Mizoguchi & Martins-Santos (1998), estudando quatro populações da bacia do rio Paraná e por Maistro *et al.* (1998), analisando nove populações de *A. scabripinnis* provenientes das sub-bacias dos rios Paranapanema, Pardo e Tietê, permitiram caracterizar as diferentes populações através de análises citogenéticas e morfométricas, corroborando a hipótese da existência do “complexo *scabripinnis*”.

A intensificação das análises citogenéticas vem mostrando que várias situações podem estar presentes entre as diversas populações de *Astyanax scabripinnis*. Exemplares desta espécie coletados em um mesmo rio (Piracuana), mas em diferentes altitudes (1800 e 780m), apresentaram o mesmo número diplóide de $2n=50$ cromossomos, mas com constituições cariotípicas, padrões de bandamento C e de distribuições das RONS distintas (Souza & Moreira-Filho, 1995). Em condições de

sintopia e simpatria, Souza *et al.* (1995) detectaram dois citótipos distintos em exemplares capturados no córrego Canta Galo, componente da sub-bacia do rio Tietê, sendo um com $2n=50$ e outro com $2n=48$ cromossomos, apresentando também variações na distribuição de heterocromatina constitutiva. A mesma situação foi observada por Maistro *et al.* (2000) entre exemplares capturados no rio Tamanduá/SP, tributário do rio Paranapanema, onde há também ocorrência simpátrica de citótipos com $2n=48$ e $2n=50$. Segundo os autores de ambos os trabalhos, as diferenças numéricas e estruturais entre os dois citótipos, ainda que com o mesmo número de braços (NF), sugerem que principalmente rearranjos do tipo robertsoniano tenham atuado na diversificação dos mesmos, ou que os citótipos teriam se originado de estoques diferentes e apenas recentemente passaram a viver em simpatria.

A análise cariotípica de exemplares da espécie *A. scabripinnis* também tem revelado a ocorrência de um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários, tendo sido identificados diferentes tipos de cromossomos B com base na sua morfologia e nos padrões de heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000b.). Também foi verificado que a frequência dos cromossomos B pode variar nas populações, de acordo com a altitude da localidade de estudo (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Neo *et al.*, 2000). Porto-Foresti *et al.*, 1997 estudaram a frequência dos cromossomos supranumerários e a densidade populacional dessa espécie em três trechos consecutivos do córrego do Cascatinha (Botucatu, SP), tendo sido verificada maior frequência de cromossomos B nos indivíduos capturados nas regiões mais elevadas. Estudos realizados por Neo *et al.* (2000) em três populações de *A. scabripinnis* que ocorrem em diferentes altitudes, em um mesmo riacho, identificaram a

presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920m e 1800m), assim como sua ausência na população de 700m. Os autores concordaram que o modelo encontrado seria melhor interpretado sob a luz da teoria parasítica de evolução de cromossomos B, segundo o qual esses elementos seriam mais frequentes em condições ambientais mais favoráveis para a espécie. Neo *et al.* (2000) propuseram que o macrocromossomo B metacêntrico, bem como o microcromossomo encontrados em indivíduos das populações analisadas, teriam se originado simultaneamente como isocromossomos, a partir de um cromossomo do grupo subtelocêntrico/acrocêntrico presente no complemento padrão desta espécie, e que os demais tipos de cromossomos B encontrados apresentariam uma forma derivada do grande metacêntrico B.

Outras ocorrências de cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* foram descritas em exemplares do rio Jacu (ES), tendo sido evidenciados exemplares com 0 a 4 microcromossomos supranumerários restritos somente aos machos da espécie (Rocon Stange & Almeida-Toledo, 1993). Em diferentes populações estudadas por Salvador & Moreira-Filho (1992) em Campos de Jordão (SP), os autores verificaram a ocorrência de 1 a 2 cromossomos B metacênicos em exemplares de ambos os sexos. Ainda nesta mesma região, Vicente *et al.* (1996) verificaram a ocorrência de cromossomos B em indivíduos de três populações, todas apresentando variação na frequência dos cromossomos extras entre os sexos e entre populações. Entretanto, em uma população de *Astyanax scabripinnis* da bacia do Paraná, foi observada uma variação intraindividual de 0 a 2 microcromossomos B, presentes somente em células de fêmeas (Mizoguchi & Martins-Santos, 1997). Macrocromossomos B restritos somente às células de fêmeas de *Astyanax scabripinnis* foram também encontrados em uma população do rio Araquá,

Botucatu (SP) (Maistro *et al.*, 1994). Contudo, estudos posteriores realizados por Porto-Foresti *et al.* (1997), evidenciaram a presença de cromossomos B em exemplares de ambos os sexos para a população do córrego Cascatinha.

O grande número de relatos sobre cromossomos B determinaram a proposição de diferentes hipóteses sobre a origem e a manutenção desses elementos genômicos nas populações de *A. scabripinnis*. Salvador & Moreira-Filho (1992) e Maistro *et al.* (1992) consideraram a hipótese de que os cromossomos B encontrados nesta espécie seriam resultado de um evento de não-disjunção de um dos elementos do primeiro par, um metacêntrico grande, seguido de um processo de heterocromatinização total ou parcial desse cromossomo extra. Entretanto, Vicente *et al.* (1996) sugerem que os macrocromossomos B em *A. scabripinnis* poderiam ter surgido a partir de um isocromossomo, resultante de um dos cromossomos do complemento normal. A utilização de sequências de DNA repetitivo do tipo minisatélite, obtidas pela digestão de DNA total com enzima *KpnI* e obtenção de sondas específicas, utilizadas no mapeamento físico dos cromossomos pela técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente, evidenciou marcações em ambos os braços do cromossomo B e na região intersticial do cromossomo 24. A confirmação obtida pela análise pelo complexo sinaptonêmico, que revelou 26 cromossomos completamente pareados em machos e a formação de um anel univalente do cromossomo B, deram um forte suporte para a hipótese de que os cromossomos B seriam isocromossomos (Mestriner *et al.*, 2000). Por outro lado, uma hipótese alternativa para explicar a origem dos cromossomos B foi proposta por Foresti (1998). De acordo com esse autor, sequências de nucleotídeos formadas continuamente no núcleo das células pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados, com a formação de sequências centroméricas

e teloméricas também ao acaso, poderiam dar origem e formação “de novo” a segmentos “non sense”, que teriam o comportamento fisiológico dos cromossomos supranumerários nas células, que seriam submetidos aos mecanismos da seleção natural que controlariam sua manutenção e comportamento. Contudo, a hipótese mais aceita atualmente em relação à origem dos B é a do isocromossomo (Vicente *et al.*, 1996; Mestriner, 2000; Jesus *et al.*, 2003).

A ocorrência de dois cromossomos supranumerários em um exemplar diplóide de *A. scabripinnis* de Campos de Jordão (SP), que apresentava triploidia natural, foi relatada por Néó *et al.*(2000). Por outro lado, Maistro *et al.*(1994) descreveram exemplares triplóides desta espécie, portadores de um e de dois macrocromossomos B, em exemplares respectivamente capturados no rio Araquá e no córrego das Pedras, ambos componentes da bacia do Rio Tietê.

Quanto às regiões organizadoras de nucléolo (RONs), podemos encontrar em Characidae cariótipos que mostram apenas um par de RONs ou cariótipos com múltiplas RONs. Particularmente em peixes, as RONs tem sido alvo de intensos estudos, que relacionam a evolução dos grupos com os graus de polimorfismo de tamanho, número e localização deste segmento genômico (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo & Foresti, 1985; Galetti Jr., 1998). Em *Astyanax*, além de indivíduos portadores de apenas um par de cromossomos envolvidos com as RONs, também são encontradas variações intra-específicas, como no caso de exemplares de *A. scabripinnis* que apresentaram de 1 a 15 RONs (Rocon-Stange & Almeida Toledo, 1993; Souza & Moreira-Filho, 1995; Vicente *et al.*, 1996; Ferro *et al.*, 2001).

A heterocromatina constitutiva em peixes é normalmente estudada pela aplicação da técnica de bandamento C, para caracterizar distintos modelos de distribuição nos

cariótipos. Análises comparativas dos padrões de distribuições têm direcionado para um grande entendimento da genética e das relações evolutivas dentro e entre diferentes grupos, além de contribuírem para estudos taxonômicos (Galetti Jr. *Et al.*, 1991; Almeida-Toledo *et al.*, 1996). Em *Astyanax*, os estudos das regiões heterocromáticas têm sido utilizados para caracterizar populações (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Maistro., 1998).

A diversidade presente em *A. scabripinnis* não é detectada apenas através de análises citogenéticas. Estudos de genética bioquímica têm evidenciado a diversidade deste grupo (Santos, 2000). Assim, entende-se que estudos morfológicos, cromossômicos e genético-bioquímicos têm muito a distribuir para uma melhor compreensão das relações genéticas e evolutivas destes animais.

Apesar de já existir um grande número de informações com diferentes tipos de abordagens em diversos grupos de organismo, com a finalidade de esclarecer a origem e as possíveis funções dos enigmáticos cromossomos B, existem ainda muitas questões não respondidas. Sendo assim, as pesquisas que estão sendo realizadas sobre esses cromossomos, têm a finalidade de buscar uma melhor compreensão dos processos de origem e fixação desses elementos genômicos nas populações e também da sua possível função, buscando desvendar o papel desses cromossomos no genoma dessa espécie.

1.6 Mapeamento genômico

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado que as sondas formadas por sequências específicas de DNA podem ser utilizadas como ferramentas para definir a estrutura do genoma e revelar sua organização e evolução nas espécies,

além da grande possibilidade de sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcadores citogenéticos entre diferentes espécies.

Marcadores citogenéticos e genéticos baseados no DNA têm sido desenvolvidos para emprego na aquicultura, com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. De modo semelhante, diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a construção de mapas genéticos, que podem oferecer benefícios particulares para a aquicultura, especialmente para a identificação de estoques, análises de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações. Os mapas genéticos são de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, filogeográficos e evolutivos, entre outros.

Atualmente, os mapas genéticos podem ser construídos de três maneiras: (1) pelo mapeamento físico que localiza segmentos de DNA nos cariótipos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) por métodos de estabelecimento de mapas genéticos de ligação, que se destinam a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos baseando-se na frequência de recombinação entre os locos gênicos; e (3) o tipo de mapa que se baseia no sequenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins *et al.*, 2004).

1.7 Mapeamento cromossômico e sequências repetitivas de DNA

Os primeiros estudos com genomas completamente seqüenciados foram focados nas sequências de cópia única ou com pequeno número de cópias. Pouca atenção foi dada, até então, aos DNA repetitivos e segmentos duplicados. Na maioria dos organismos, as sequências repetitivas compreendem uma grande porção do genoma. Em

cebola elas representam 95% do genoma (Flavell *et al.*, 1974) e em humanos 50% ou mais do genoma (The Genome International Sequencing Consortium, 2001), sendo que a variação no tamanho do genoma de diferentes eucariotos está frequentemente associada a diferenças na quantidade de sequências repetitivas (Kidwell, 2002).

Ainda são relativamente pouco conhecidas as funções das sequências repetitivas no genoma das espécies, as quais foram consideradas por muitos anos como DNA “egoísta” (Doolittle e Sapienza, 1980; Orgel e Crick, 1980) ou como DNA “lixo” (Nowak, 1994), não sendo até então atribuídas contribuições biológicas significativas para seus carregadores. Por outro lado, alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento destas sequências com a manifestação de algumas doenças (Kazazian *et al.*, 1988), com a regulação e reparo de alguns genes (Messier *et al.*, 1996), assim como com a diferenciação de cromossomos sexuais (Anleitner e Haymer, 1992; Kraemer e Schmidt, 1993) e apenas mais recentemente seu papel na organização estrutural e funcional dos genomas tem sido demonstrado (Schueler *et al.*, 1993). Porém, a função mais significativa das sequências repetitivas parece estar relacionada aos segmentos repetitivos dos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, desempenhando uma função estrutural.

O DNA repetitivo inclui sequências organizadas em cadeias, como as sequências satélites, minissatélites e microssatélites e as sequências dispersas como os transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994). Além dessas classes, há também as famílias multigênicas compostas por centenas ou milhares de cópias de sequências que codificam importantes moléculas como os diferentes tipos de RNAs ribossômicos (rRNA) e as histonas, por exemplo.

Entre os genomas seqüenciados, as regiões ricas em elementos repetitivos permanecem como grandes *gaps* por causa da dificuldade em se determinar sua correta posição e número de cópias. A integração dos dados sobre sequenciamento completo do genoma e mapeamento cromossômico pode promover um incremento no conhecimento do genomas. Assim, as seqüências de DNA repetitivos podem ser utilizadas como marcadores cromossômicos úteis em estudos evolutivos, na identificação de cromossomos específicos, cromossomos homólogos, rearranjos cromossômicos, cromossomos sexuais e em estudos de genética aplicada e comparada.

Embora nas duas últimas décadas estudos citogenéticos tenham sido realizados em um grande número de espécies de peixes, tais análises foram principalmente direcionadas para o conhecimento básico da estrutura cariotípica, sendo relativamente poucos trabalhos realizados visando à caracterização e mapeamento cromossômico.

O estudo de seqüências repetitivas de DNA tem se mostrado útil no esclarecimento de inúmeras questões, incluindo a estrutura de regiões centroméricas e teloméricas, origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos B e evolução do genoma como um todo. Este tipo de seqüências de DNA podem encontrar aplicação também no mapeamento físico do genoma, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos de importância significativa na biologia básica e aplicada das espécies. A construção e integração de mapas físicos e genéticos representam a melhor estratégia para o entendimento da estrutura e evolução do genoma de diversas espécies.

Nesse sentido, a realização do mapeamento genômico de indivíduos de diferentes populações, realizado com base na localização e dispersão de sítios repetitivos dos genes ribossomais 5S e 18S, poderão fornecer informações sobre a dinâmica destes genes nos cariótipos e sobre os mecanismos de diversificação cromossômica das espécies,

contribuindo com informações de interesse para estudos filogenéticos e evolutivos neste grupo.

1.8 Estudo e evolução dos cromossomos supranumerários

Muitos relatos sobre cromossomos B foram feitos e diferentes hipóteses sobre a origem e a manutenção desses cromossomos nas populações de *A. scabripinnis* foram levantadas. Salvador & Moreira-Filho (1992) e Maistro *et al.* (1992) consideraram a hipótese de que os cromossomos B encontrados nesta espécie seriam resultado de um evento de não-disjunção de um dos elementos do primeiro par, um metacêntrico grande, seguido de um processo de heterocromatinização total ou parcial desse cromossomo extra. Entretanto, Vicente *et al.* (1996) sugerem que os macrocromossomos B em *A. scabripinnis* poderiam ter surgido a partir de um isocromossomo, resultante de um dos cromossomos do complemento normal. A localização de sequências de DNA repetitivo minisatélites obtidos da digestão de DNA total com enzima *KpnI*, pela técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente em ambos os braços do cromossomo B e na região intersticial do cromossomo 24 e a confirmação da análise pelo complexo sinaptonêmico, formado por 26 cromossomos completamente pareados em machos e formação de um anel univalente do cromossomo B, deram um forte suporte para a hipótese de que os cromossomos B são isocromossomos (Mestriner *et al.*, 2000). Por outro lado, Foresti (1998) propõe uma hipótese alternativa para a origem dos B. De acordo com esse autor, sequências de nucleotídios formados continuamente pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados, com a adição de sequências centroméricas e teloméricas, permitiriam a formação “de novo” de segmentos longos e a manutenção dessas estruturas no genoma. Contudo, a hipótese

mais aceita atualmente sobre a origem dos cromossomos B nesta espécie seria a partir da formação do isocromossomo (Vicente *et al.*, 1996; Mestriner, 2000; Jesus *et al.*, 2003).

Recentemente, sequências de DNA presentes nos cromossomos B têm sido estudadas em alguns organismos (Camacho *et al.*, 2000). As primeiras análises realizadas nos anos de 1980 e 1990 demonstraram que os cromossomos B continham DNA similar ao encontrado nos cromossomos do conjunto padrão A (Jones & Rees, 1982). Com isso, estudos envolvendo isolamento, clonagem e seqüenciamento de numerosos fragmentos de DNA repetitivos presentes nos cromossomos B de diversas espécies têm sido realizados a partir da década de 90 (Camacho *et al.*, 2000).

Algumas sequências de DNA são específicas dos cromossomos B; entretanto, outras são compartilhadas com aquelas encontradas nos cromossomos do complemento padrão A (Beukeboom 1994; Hackstein *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000, Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006). Os cromossomos supranumerários são geralmente compostos por seqüências de DNA repetitivo, as quais variam dinamicamente em termos de tipos de repetições e número de cópias (Amos & Dover, 1981; Matzke *et al.*, 1990; Sandery *et al.*, 1990; Eickbush *et al.*, 1992; Zeyl & Green 1992; Wilkes *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003).

O simples fato de sequências de DNA serem compartilhadas entre os cromossomos A e B nos indivíduos portadores incita à hipótese da origem intra-específica destes cromossomos extras (Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000). Por outro lado, as sequências de DNA específicas de B poderiam ter surgido de uma rápida diferenciação e seguido um processo evolutivo independente, ocasionando a perda de homologia com as sequências dos cromossomos A dos quais teriam sido derivadas (hipótese intra-específica) (Jamilena *et al.*, 1994, 1995; Houben *et al.*, 1996; Peppers *et*

al., 1997; Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000 entre outros), ou que os cromossomos B tenham sido derivados de cromossomos introduzidos por meio de acasalamentos interespecíficos (hipótese interespecífica) (Sapre & Deshpande, 1987; McVean, 1995; Scharl *et al.*, 1995; Perfectti & Werren, 2001, entre outros) e permanecido sem homologia com os demais cromossomos do genoma da espécie hospedeira. Neste caso existem poucas descrições do surgimento de cromossomos acessórios (Perfectti & Werren, 2001). A maioria das hipóteses, entretanto, tem se estabelecido a partir da idéia de uma origem intra-específica, na qual os cromossomos B são derivados do componente do complemento cromossômico da própria espécie, pelo fato de compartilharem seqüências de DNA homólogas (Camacho *et al.*, 2000).

Na busca dos mecanismos de origem e evolução dos cromossomos supranumerários, vários estudos concernentes à análise das seqüências de seu DNA têm sido realizados em diferentes organismos como insetos (Eickbush & Werren, 1992; López-León *et al.*, 1994; Cabrero *et al.*, 1999; Perfectti & Werren, 2001), plantas (Cuadrado & Jouve, 1994; Jamilena *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996) e anfíbios (Sharbel *et al.*, 1998). Todavia, ainda são escassos os trabalhos relativos às análises das seqüências do DNA nos cromossomos B de peixes.

Com o uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), várias sondas cromossômicas vêm sendo produzidas, com o intuito de proporcionar um melhor entendimento sobre questões evolutivas, filogenéticas e estruturais e funcionais, no estudo do genoma de peixes neotropicais. Dentre as sondas já obtidas, têm destaque àquelas relativas a segmentos repetitivos do genoma, como a sonda As51 de *Astyanax scabripinnis* obtida por Mestriner *et al.* (2000), sondas SATH1 e SATH2 de *Prochilodus*

lineatus (Prochilodontidae) obtida por Jesus *et al.* (2003) e a sonda 18S DNAr de *Prochilodus argenteus*, obtida por Hatanaka & Galletti (2004).

O método de construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvido e aplicado a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992) tem sido amplamente utilizado em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, esta metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes e a obtenção de sondas específicas de cromossomos supranumerários neste grupo tornou-se uma prioridade na estruturação de mapas genômicos. Até o presente momento, sondas para este tipo de polimorfismo cromossômico foram descritas somente por meio da utilização de enzimas de restrição.

2 OBJETIVOS

Constatando-se a necessidade de informações sobre a estrutura e papel dos rearranjos cromossômicos na estruturação do genoma dos peixes, foram realizadas investigações sobre as características citogenéticas em *Astyanax scabripinnis*, tendo por objetivos principais:

- a) caracterizar citogeneticamente diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* encontradas nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema (região de Botucatu), inicialmente através da coloração convencional Giemsa;
- b) identificar a localização e distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), nos representantes de populações desta espécie em diferentes localidades, através de impregnação com nitrato de Prata e Cromomicina A₃ (CMA₃ - fluorocromo específico para regiões GC);
- c) identificar os padrões de distribuições de heterocromatina constitutiva (Banda C) nos cromossomos dos indivíduos nas populações;
- d) identificar a presença de cístrons ribossômicos nos cromossomos do complemento A, com a aplicação da técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), utilizando sondas de DNAr 5S e 18S;
- e) identificar, com o uso das técnicas de bandamento clássico e molecular, marcadores que possam fornecer informações comparativas entre as diferentes populações;
- f) estabelecer os padrões de diversificação e interpretar os mecanismos envolvidos no processo de especiação deste grupo de peixes;

g) contribuir com informações citogenéticas tanto para a compreensão das relações entre as espécies do gênero *Astyanax* quanto entre as diferentes populações da espécie *A. scabripinnis*, correlacionando os resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.

3 MATERIAL

Os exemplares coletados foram previamente identificados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, para confirmação da espécie alvo do estudo. Foram analisados 173 exemplares da espécie *Astyanax scabripinnis* (Figura 1), coletados em diferentes localidades do Estado de São Paulo (Tabela 1 e figura 2), em componentes das bacias hidrográficas dos rios Paranapanema e Tietê, respectivamente córregos Cascatinha (Figura 3), córrego Cintra (Figura 4), córrego Estância Funari (Figura 5), córrego Capão Bonito (Figura 6) e córrego Cachoeira do Barbosa (Figura 7).

Os animais foram coletados com o auxílio de puçás e redes de arrasto. Após serem capturados, foram transportados até o laboratório e mantidos em aquários aerados até seu sacrifício para a obtenção de preparações de cromossomos metafásicos, através da extração de fragmentos de tecidos da porção anterior do rim e brânquias, em alguns casos. Para os estudos moleculares foram coletadas amostras de tecido do fígado ou músculo, com o intuito de se proceder posteriormente à extração e purificação do DNA.

Bacia do rio Tietê	fêmeas	machos	latitude/longitude
córrego Cascatinha	39	34	S 22° 53' 25.3'' W 48° 29' 20.4''
córrego Cintra	29	23	S 22° 52' 37.2'' W 48° 28' 55.2''
córrego Funari	09	08	S 22° 53' 09.1'' W 48° 29' 22.3''

Bacia do rio Paranapanema	fêmeas	machos	latitude/ longitude
córrego Capão Bonito	10	12	S 22° 54' 58.1'' W 48° 30' 22.5''
córrego Cachoeira do Barbosa	03	06	S 22° 55' 43.6'' W 48° 30' 22.5''

Tabela 1 – Locais de coleta, número de exemplares estudados e localização geográfica dos pontos de captura dos exemplares de *Astyanax scabripinnis*.

Após o processamento, os peixes foram numerados de acordo com o livro de registros do laboratório, fixados inicialmente em formol a 10% e posteriormente conservados em álcool etílico a 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

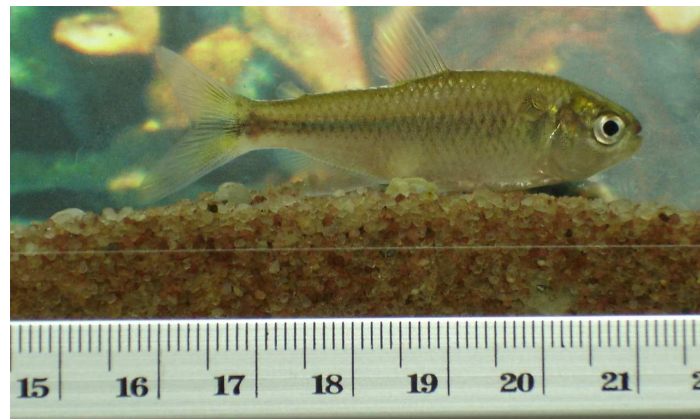


Figura 1 - Exemplar de *Astyanax scabripinnis*, proveniente do córrego da Cascatinha.

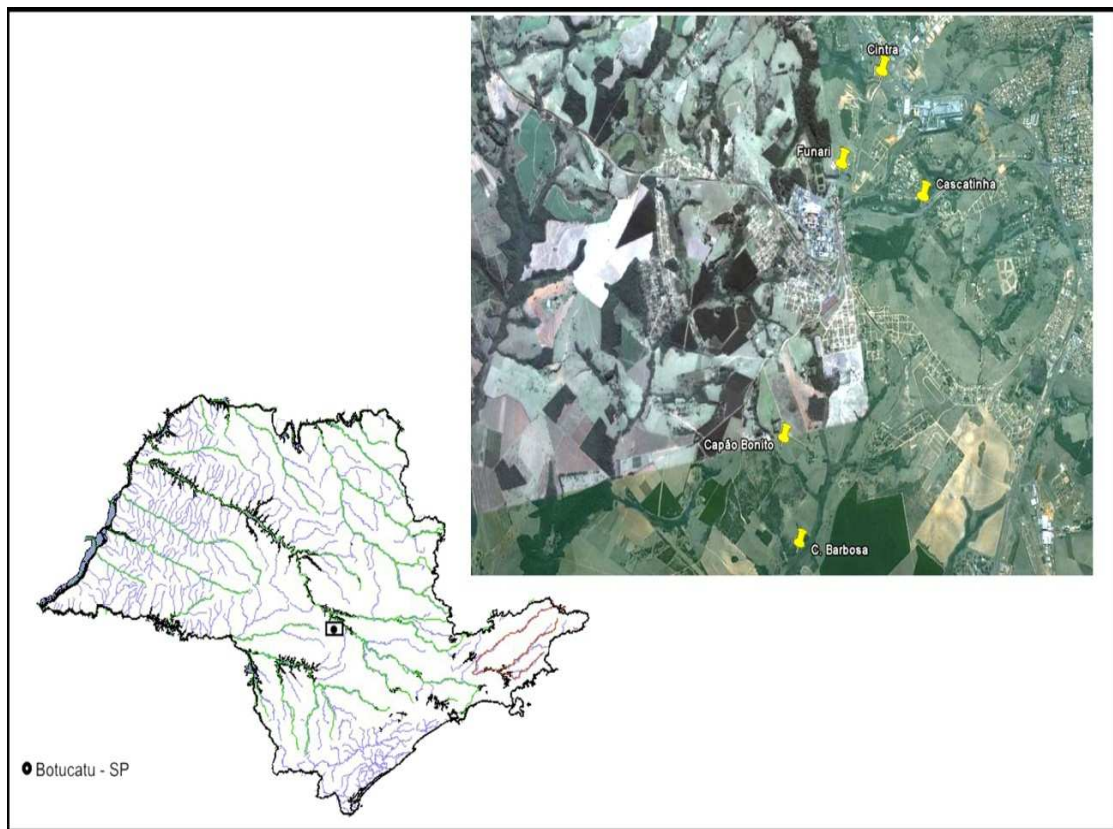


Figura 2 – Mapa hidrológico do Estado de São Paulo, evidenciando as bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema, indicando os locais de coleta córregos Cascatinha, Cintra, Estância Funari, Capão Bonito e Cachoeira do Barbosa. b(fonte:Google imagens).



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7

Locais de coleta de *A.scabripinnis* em componentes das bacias dos rios Tietê e Paranapanema na região de Botucatu. **Figura 3-** Córrego Cascatinha; **Figura 4-** Córrego Cintra; **Figura 5-** Córrego Funari; **Figura 6-** Córrego Capão Bonito; **Figura 7-** Córrego Cachoeira do Barbosa.

4 MÉTODOS

4.1 Estimulação de Mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada a técnica de estimulação da divisão celular através da injeção prébia de solução de fermento biológico nos exemplares, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos e adaptada para peixes por Oliveira *et al.* (1988b). O procedimento consiste em:

- a) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção - 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada;
- b) incubar a solução em banho-maria (40° C) por cerca de 20 minutos;
- c) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1ml/100g de peso do animal;
- d) deixar o animal em aquário bem aerado por 48 a 72 horas.

4.2 Preparações de cromossomos mitóticos

A técnica utilizada para a obtenção de preparações cromossômicas para a análise citogenética, realizada em células extraídas de tecido da parte anterior do rim para a obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*, foi a descrita por Foresti *et al.* (1981), e utilizada com algumas modificações. O procedimento consiste em:

- a) injetar no animal com uma seringa solução aquosa de colchicina 0,025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) na região intra-abdominal, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Deixá-lo nadando livremente por 50 minutos;

- b)** sacrificar o animal retirando o tecido renal, de preferência o tecido localizado na porção anterior do órgão, com o auxílio de tesouras e pinças de ponta fina;
- c)** colocar os fragmentos de tecido retirados em placa de Petri contendo cerca de 6ml solução hipotônica (KCl 0,075M);
- d)** 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 o auxílio de uma Pipeta Pasteur;
- e)** retirar a suspensão celular da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrifuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37° C, durante 21 minutos;
- f)** retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de solução fixadora gelada (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Deixar em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente;
- g)** adicionar cerca de 6ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar para centrifuga a 1000rpm por 10 minutos;
- h)** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador;
- i)** centrifugar por 7 minutos a 1000rpm;
- j)** centrifugar por mais 2 ou 3 vezes;
- D)** pingar o material em lâminas e secá-las ao ar livre.

4.3 Coloração com Giemsa

Para coloração com Giemsa, utilizou-se o seguinte procedimento:

- a)** hidrolisar o material contido na lâmina em HCL 1N a 60° C por cerca de 3 minutos;

- b) corar com uma solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos.
- c) deixar secar e examinar ao microscópio.

4.4 Detecção de heterocromatina constitutiva (banda C)

Para a obtenção de bandas C, foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações, conforme o descrito abaixo:

- a) hidrolisar o material das lâminas por 30 minutos em HCL 0,2N, à temperatura ambiente;
- b) lavar a lâmina em água destilada;
- c) passar por uma solução de hidróxido de bário $Ba(OH)_2$ cerca de 1 minuto;
- d) lavar em HCL 1N a 60° C. Lavar em água destilada;
- e) incubar por 30 minutos em 2x SSC (pH=6,8), a 60° C;
- f) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa na proporção de 1:20 em tampão fosfato (pH=6,7).

4.5 Localização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), através da impregnação com nitrato de Prata

As RONS foram detectadas utilizando-se a técnica de impregnação com nitrato de Prata descrita por Howell & Black (1980).

São utilizadas duas soluções:

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

- Solução B: solução de nitrato de Prata: 1g de AgNO_3 dissolvida em 2ml de água deionizada.

Essas soluções, depois de preparadas, devem ser mantidas em frascos escuros, a 4° C.

O procedimento utilizado para coloração das RONS foi o seguinte:

- a) hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 minutos em HCL 1N a 60° C;
- b) secar as lâminas;
- c) pingar uma gota de solução A e duas gotas de solução B sobre o material na lâmina, cobrir com lamínula;
- d) deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60° C;
- e) em alguns minutos (aproximadamente 3 minutos) a mistura das soluções se torna marrom dourada;
- f) lava-se a lâmina em água deionizada e deixa-se secar;
- g) corar com Giemsa na proporção de 1:30 da solução-mãe em tampão fosfato (pH=6,7) por 30 segundos.

4.6 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:

- a) colocar sobre as lâminas uma solução de tampão McIlvaine + MgCl_2 e cobrir com lamínula. Incubar em placa de Petri umidecida com o mesmo tampão por 10 minutos;
- b) retirar o tampão da lâmina cm pipeta Pasteur e, sem lavar as lâminas, secar a parte de trás das mesmas;

- c) 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;
- d) retirar as lamínulas em tampão McIlvaine, lavando as lâminas vagarosamente nesta solução;
- e) incubar as lâminas em solução methyl-green/hepes por 15 minutos;
- f) lavar as lâminas em solução de hepes/NaCl;
- g) secar as lâminas, pingar sobre elas uma gota de glicerol com propilgalato e depositar uma lamínula para montagem de uma lâmina permanente;
- h) deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 20 dias antes da análise;
- i) observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

4.7 Microdissecção cromossômica

Para a realização da técnica de microdissecção cromossômica, foram utilizadas preparações cromossômicas de exemplares de *Astyanax scabripinnis*, coletados no córrego do Cascatinha, Botucatu (SP), portadores de somente um cromossomo B (um metacêntrico grande). O cromossomo em questão foi capturado das preparações com o auxílio de um micromanipulador TransfermanR NK2 (Eppendorf) acoplado à um microscópio invertido Axiovert 100 (Zeiss) e equipado com microagulhas de vidro. Após capturados, foram depositados em solução Mix para amplificação contida em tubo Eppendorf.

4.7.1 Preparo das microagulhas

Os capilares de vidro com diâmetro de 1.0mm (World Precision Instruments, Inc.) foram submetidos à temperatura de 51-53oC num *micropipette puller* (PC-10

Narishigue) para a obtenção de microagulhas com diâmetro compatível com o tipo de cromossomo a ser microdissectado.

4.7.2 Processamento da microdissecção cromossômica

Para a realização da microdissecção cromossômica, foi utilizado o material resultante da suspensão celular mantida em metanol, seguindo-se o procedimento que consistiu em: retirar uma alíquota e acrescentar ácido acético (3 partes de suspensão celular para 1 parte de ácido acético). Pingar uma ou duas gotas sobre uma lamínula bem limpa. Corar a preparação cromossômica com Giemsa a 5% por 10 minutos para a identificação do cromossomo de interesse. Microdissectar cerca de 10 cromossomos por experimento. Após cada microdissecação, quebrar a ponta da microagulha no interior de um tubo de 0,5ml contendo o mix da primeira reação de amplificação (DOP-PCR) ou uma solução de proteinase K 20ng/μl (SCOMP).

4.7.3 Obtenção de sondas a partir de cromossomos microdissectados - DOP-PCR

A metodologia de DOP-PCR foi utilizada para a amplificação e marcação do DNA dos cromossomos microdissectados. Esta técnica de PCR consiste numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados com o uso de um *primer* degenerado (DOP - Degenerate Oligonucleotide Primer), conforme proposto por Telenius *et al.* (1992). A DOP-PCR compreende duas etapas de amplificação, uma de baixa estringência (primeira PCR) e outra de alta estringência (segunda PCR) e PCR de marcação.

4.7.3.1 Primeira PCR

Na primeira amplificação, condições de baixas temperaturas permitem o anelamento do *primer* degenerado e a extensão de vários sítios no genoma.

Num tubo de 0,5ml, preparar um mix contendo os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	15,0µl
Tampão Termosequenase (10x)	2,5µl
dNTP (2mM cada)	2,5µl
Primer DOP (10µM)	2,5µl

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0,5ml, contendo o mix acima, aquecer a 95oC por 10 min e centrifugar brevemente. Em seguida, acrescentar 2,5µl da enzima Termosequenase 4U/µl (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB). As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200TM Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc.) de acordo com as seguintes condições:

12 ciclos	{	94°C ---- 3min
		94°C ---- 1min e 30seg
		37°C ---- 2min
		37°C ---- 1min, com acréscimo de 0,2°C/seg até 72°C
		72°C ---- 2min
30 ciclos	{	94°C ---- 1min e 30 seg
		62°C ---- 1min
		72°C ---- 30seg
		Manutenção a 4°C

Checar os produtos da reação de amplificação em gel de agarose a 1%.

4.7.3.2 Segunda PCR

A segunda amplificação foi preparada para um volume final de 50µl num tubo de 0,5ml, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	28,5µl
Tampão da enzima (10x)	5,0µl
MgCl ₂ (50mM)	4,0µl
dNTP (2mM cada)	5,0µl
Primer DOP (10µM)	5,0µl
Taq (5U/µl)	0,5µl
Produto da 1ª PC	2,0µl

Posteriormente, a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições:

30 ciclos {

- 90°C ---- 3min
- 94°C ---- 1min e 30seg
- 56°C ---- 1min e 30seg
- 72°C ---- 1min e 30seg
- Manutenção a 40C

Checar os produtos da reação de amplificação em gel de agarose a 1%.

4.7.3.3 PCR de marcação

No PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo, para um volume final de 50µl. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.

Água milli-Q autoclavada para marcação com biotina	29,5µl
ou	ou
Água milli-Q autoclavada para marcação com digoxigenina	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	0,5µl

ou dTTP (2mM) para marcação com digoxigenina	ou 0,6µl
Biotina-16-dUTP (1mM)	0,5µl
ou Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	ou 0,7µl
Primer DOP (10µM)	5,0µl
Taq (5U/µl)	0,5µl
Produto da 2ª PC	2,0µl

Checar os produtos da reação de amplificação em gel de agarose a 1%.

4.7.4 Precipitação da sonda

Adicionar ao produto obtido anteriormente, 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3M e duas vezes o volume total de etanol absoluto gelado. Incubar a -70oC overnight, centrifugar a 16000xg por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50µl de etanol 70%. Centrifugar a 16000xg por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, secar em estufa e ressuspender em 40µl de água milliQ autoclavada.

4.7.5 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

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

4.7.5.1 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 lâmina foi preparada a seguinte reação:

dNTP mix (Kit)	1 μ l
Enzima mix (Kit)	1 μ l
DNA (200 μ g/ μ l)	1 μ l
Água estéril	X μ l
volume total	9 μ l

As substâncias foram bem misturadas, centrifugadas brevemente e incubadas por 30 minutos a 16°C.

O protocolo seguiu do seguinte modo: parar a reação com a adição de 1 μ l de *Stop Buffer*. Acrescentar à reação, 1/10 do volume (1 μ l) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22 μ l) de etanol 100% gelado. Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70° C por 1 hora. Centrifugar por 15 minutos a 15.000rpm a 4° C. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 μ L de etanol 70% gelado. Centrifugar por 5 minutos a 15.000rpm a 4° C. Descartar sobrenadante com cuidado e deixar secar. Depois, ressuspender em 6 μ L 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	29,5 μ l
ou	ou
Água milli-Q autoclavada para marcação com digoxigenina	29,2 μ l
Tampão da enzima (10x)	5,0 μ l
MgCl ₂ (50mM)	4,0 μ l
dATP (2mM)	1,0 μ l

dCTP (2mM)	1,0µl
dGTP (2mM)	1,0µl
dTTP (2mM) para marcação com biotina	0,5µl
ou	ou
dTTP (2mM) para marcação com digoxigenina	0,6µl
Biotina-16-dUTP (1mM)	0,5µl
ou	ou
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	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:

94°C ---- 5 min
 34 ciclos { 95°C ---- 1 min
 63°C ---- 1 min
 72°C ---- 1 min e 30 seg
 72°C ---- 5 min
 4°C ---- manutenção

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

4.7.5.2 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 37°C. 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 37°C. 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 70°C por 2-5 minutos. Desidratar novamente em série de etanol a 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho.

4.7.5.3 Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Este procedimento foi realizado seguindo-se o seguinte protocolo:

a) o preparo da solução de hibridação foi realizado em um tubo de 0,6ml contendo 6 µl da sonda, ao qual foram adicionados 15µl de formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC). Em seguida, a sonda foi desnaturada a 100° C por 10 minutos e passada imediatamente ao gelo;

- b)** 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 37° C overnight;
- c)** 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);
- d)** lavar as lâminas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada (com agitação);
- e)** lavar Tween 0,5% em 4xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente (com agitação).
- f)** incubar as lâminas NDFM 5% em 4xSSC por 15 minutos;
- g)** lavar as lâminas 2 vezes em Tween 0,5% em 4xSSC a temperatura ambiente (com agitação);
- h)** 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.
- i)** Detectar a dupla FISH com 4µl de FITC + 4µl de antidigoxi + 22 µl de NDFM por 1 hora a 37°C em câmara úmida;
- j)** lavar as lâminas 3 vezes em Tween 0,5% em 4xSSC por 5 minutos (com agitação).
- l)** Desidratar as lâminas em série de álcool 70%, 85% e 100% por 5 minutos em cada banho. Secar;
- m)** 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.

4.8 Análises cromossômicas

As suspensões celulares coradas com Giemsa, submetidas à coloração com nitrato de Prata para a localização das RONS e submetidas à técnica de bandamento C para identificação de heterocromatina constitutiva foram analisadas em microscópio óptico. As preparações cromossômicas submetidas às técnicas citogenéticas foram analisadas em microscópio óptico Olympus. As imagens foram capturadas com o uso do programa Image Pro Plus versão 6.0 para Windows (Media Cybernetics) e 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 (m) (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (sm) (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (st) (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB maior que 7,00). Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo (m, sm, st, a) e em ordem decrescente de tamanho.

4.9 Montagem dos Cariótipos

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos, estes foram identificados, emparelhados com seus prováveis homólogos e organizados para a disposição final do cariótipo.

5 RESULTADOS

Os resultados e a discussão dos dados obtidos nas análises citogenéticas e de citogenética molecular encontram-se apresentados na forma de capítulos, referentes aos tópicos abordados. As citações bibliográficas referentes a cada capítulo estão discriminadas no item Referências, visando otimizar a apresentação da dissertação.

5.1 CAPÍTULO I - ESTUDOS CITOGENÉTICOS CLÁSSICOS EM *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), EM COMPONENTES DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS TIETÊ E PARANAPANEMA, SP.

5.2 CAPÍTULO II- MAPEAMENTO GÊNICO DE SÍTIOS REPETITIVOS DE DNAr 5S E 18S EM *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).

5.3 CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO SUPRANUMERÁRIO DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) POR SONDA CROMOSSÔMICA OBTIDA POR MICRODISSECÇÃO.

CAPÍTULO I

Estudos citogenéticos clássicos em *Astyanax scabripinnis*,
em componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e
Parapanema, SP

RESUMO

Astyanax scabripinnis é uma espécie de peixe de pequeno porte, popularmente conhecida como lambari. Vem sendo estudada com grande interesse por possuir uma ampla diversidade cariotípica, com números diplóides de $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$ e um cariótipo diversificado. Além disso, é comum nesta espécie a presença de cromossomos supranumerários e casos de triploidia natural. No presente estudo, com a aplicação de técnicas clássicas de citogenética utilizando coloração básica dos cromossomos, foi possível caracterizar cinco populações da espécie *Astyanax scabripinnis* a partir da análise de exemplares coletados em córregos componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema. Os resultados evidenciaram um cariótipo composto por $2n=50$ cromossomos, comum a todos os exemplares de todas as localidades. As técnicas citogenéticas utilizadas, após a estimulação mitótica, foram a coloração convencional com Giemsa, identificação dos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva (bandas C), detecção das regiões organizadoras de nucléolo pela impregnação com nitrato de Prata (Ag-RONs) e coloração com o fluorocromo CMA₃. Os resultados obtidos revelaram fórmulas cariotípicas diferentes para cada população, sendo de (6m, 16sm, 14st, 14a) para os exemplares do córrego da Cascatinha; (6m, 20sm, 14st, e 10a) do córrego Cintra; (4m, 18sm, 16st e 12a) do córrego da Estância Funari; (6m, 16sm, 14st, 14a) do córrego Capão Bonito e (6m, 16sm, 14st, 14a) do córrego Cachoeira do Barbosa. A técnica de bandamento C revelou a presença de blocos heterocromáticos na região terminal do braço longo dos cromossomos nos exemplares de três localidades, córrego da Cascatinha, córrego do Cintra e córrego da Estância Funari, enquanto os do córrego Capão Bonito revelaram blocos heterocromáticos na região centromérica de alguns cromossomos do complemento. Na amostra do córrego Cachoeira do Barbosa, além das marcações centroméricas também foram detectadas marcações na região telomérica do braço longo

de alguns cromossomos. Com a impregnação por nitrato de Prata (Ag-RON) foi possível observar marcações múltiplas na porção telomérica do braço curto dos cromossomos nos exemplares do córrego do Cascatinha; RONS simples, marcando apenas um par, também na região telomérica do braço curto, nos do córrego do Cintra; RONS múltiplas com marcações na região intersticial de dois pares cromossômicos nos do córrego da Estância Funari; e RONS simples marcando apenas um par cromossômico na região terminal do braço curto, nos exemplares do córrego Capão Bonito e do córrego Cachoeira do Barbosa. A utilização da coloração com o fluorocromo CMA₃ revelou segmentos marcados nos mesmos cromossomos envolvidos com as RONS, nos exemplares analisados em todas as localidades.

INTRODUÇÃO

A citogenética tem gerado resultados importantes para a compreensão das relações entre ou dentro de diferentes ordens, famílias e gêneros de diferentes organismos. Em peixes, há registros de um grande número de variações cromossômicas que identificam, em parte, a adaptabilidade das espécies em diferentes ambientes. Os peixes Neotropicais apresentam uma grande variabilidade cariotípica, tanto inter quanto intra-específica, sendo que os números cromossômicos diplóides neste grupo variam de $2n=20$ cromossomos em *Pterolebias longipinnis* até $2n=132$ em *Corydoras aeneus* (Oliveira *et al.*, 1988).

Considerada componente de um complexo de espécie denominado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) de “complexo *scabripinnis*”, a espécie *Astyanax scabripinnis*, caracterizada por ampla dispersão nas bacias hidrográficas da região, apresenta grande diversidade morfológica e cariotípica. Estudos realizados por Mizoguchi & Martins-Santos (1998) em quatro populações da bacia do rio Paraná e por Maistro *et al.* (1998) em nove

populações das sub-bacias dos rios Paranapanema, Pardo e Tietê permitiram caracterizar as diferentes populações através de análises citogenéticas e morfométricas, confirmando a hipótese do “*complexo scabripinnis*”. Considerando suas características biológicas associadas a dados morfológicos, esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo atualmente um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna neotropical.

A intensificação das análises citogenéticas vem mostrando que várias situações podem estar presentes entre as diversas populações de *Astyanax scabripinnis*. Exemplos desta espécie coletados em um mesmo rio (Piracuana), mas em diferentes altitudes (1800 e 780m), apresentaram os mesmos números diplóides de $2n=50$ cromossomos, mas com constituições cariotípicas, padrões de bandamento C e de distribuição das RONS distintas (Souza & Moreira-Filho, 1995). Em outro estudo, Souza *et al.* (1995) detectaram dois citótipos distintos em condições de sintopia e simpatria, em exemplares analisados provenientes do córrego Canta Galo, sub-bacia do rio Tietê, sendo que um apresentava $2n=50$ e outro $2n=48$ cromossomos, além de variações na distribuição da heterocromatina constitutiva. A mesma situação foi observada por Maistro *et al.* (2000) nos exemplares capturados no rio Tamanduá/SP, tributário do rio Paranapanema, onde também foi verificada a ocorrência simpátrica de citótipos com $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos. Segundo os autores de ambos os trabalhos, as diferenças numéricas e estruturais entre os dois citótipos, ainda que com o mesmo número de braços (NF), sugerem que principalmente rearranjos do tipo robertsoniano tenham atuado na diversificação dos mesmos, não descartando, entretanto a possibilidade de que os citótipos teriam se originado de estoques diferentes e apenas recentemente começaram a viver em simpatria.

A análise cariotípica de exemplares da espécie *A. scabripinnis* também tem revelado a ocorrência de polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de

cromossomo supranumerário, tendo sido identificados diferentes tipos de cromossomos B com base na sua morfologia e nos padrões de heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000b.). Também foi verificado que a frequência dos cromossomos B pode variar nas populações, de acordo com a altitude da localidade de estudo (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Néó *et al.*, 2000).

Quanto às regiões organizadoras de nucléolo (RONS), podem ser encontrados em Characidae cariótipos que mostram apenas um par de RONS, bem como cariótipos com múltiplas RONS. Particularmente em peixes, as RONS tem sido alvo de intensos estudos que relacionam a evolução dos grupos com os graus de polimorfismo de tamanho, número e localização deste segmento genômico (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo & Foresti, 1985; Galetti Jr., 1998). Além disso, em *Astyanax scabripinnis* podem ser encontradas também variações intra-específicas, como no caso de exemplares que apresentaram de 1 a 15 RONS (Rocon-Stange & Almeida Toledo, 1993; Souza & Moreira-Filho, 1995; Vicente *et al.*, 1996; Ferro *et al.*, 2001).

A heterocromatina constitutiva em peixes é normalmente estudada pela aplicação da técnica de bandamento C, para caracterizar distintos modelos de distribuição nos cariótipos. Análises comparativas dos padrões de distribuições têm direcionado para um grande entendimento da genética e das relações evolutivas dentro e entre diferentes grupos, além de contribuírem para estudos taxonômicos (Galetti Jr. *et al.*, 1991; Almeida-Toledo *et al.*, 1996). Em *Astyanax*, os estudos das regiões heterocromáticas têm sido utilizados para caracterizar populações (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Souza *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Maistro., 1998).

No presente trabalho, o objetivo principal foi identificar marcadores citogenéticos pelo estudo das variações cariotípicas em diferentes populações de *Astyanax scabripinnis*

encontradas em componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema, visando a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de diversificação cromossômica nesta espécie. Por se tratar de um grupo bastante diversificado e pouco estável, informações sobre a morfologia e composição dos seus cromossomos podem auxiliar na compreensão das relações entre os componentes deste grupo de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares coletados foram previamente identificados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu, para confirmação taxonômica da espécie alvo do estudo. Foi realizada a análise citogenética de 173 exemplares da espécie *Astyanax scabripinnis* coletados em diferentes localidades do Estado de São Paulo, em componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema.

Para obtenção de maior número de mitoses, foi utilizada a técnica de estimulação da divisão celular através da injeção prévia de 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 para peixes por Oliveira *et al.* (1988).

As preparações cromossômicas para a análise citogenética foram obtida a partir fragmentos de tecido da parte anterior do rim, seguindo o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1981) e utilizado com algumas modificações.

As RONS foram detectadas utilizando-se a técnica de impregnação com nitrato de Prata, descrita por Howell & Black (1980) e para a obtenção de banda C, foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações. A detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de base GC foi realizada segundo a técnica descrita por Schweizer (1976), que emprega o corante Cromomicina A₃ (CMA₃).

RESULTADOS E DICUSSÃO

Astyanax scabripinnis é uma espécie de peixe que possui relatos de vários citótipos em diferentes populações. Vieira *et al*, (1998) descreveram o cariótipo de três populações diferentes, todas da região de Botucatu-SP. A população do ribeirão da Quinta apresentou número diplóide de $2n=50$ cromossomos, a do rio Capivara, com dois citótipos diferentes apresentou $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos e a do córrego Água da Madalena, apresentou três citótipos diferentes $2n=46$, 48 e 50, além de alguns exemplares com cromossomos supranumerários. Abel e Moreira- Filho (1998) descreveram outras duas populações, sendo cada uma proveniente de riachos diferentes da bacia do rio São Francisco com $2n=46$ e 50 cromossomos. Comparando-se os padrões cariotípicos já descritos com os das populações dos componentes das bacias dos rios Tietê e Paranapamema relatados no presente trabalho, observa-se que, apesar da grande variabilidade cariotípica estas apresentam-se dentro do padrão mais comum descrito para a espécie, com $2n=50$ cromossomos, sem diferenciação cariotípica visível entre fêmeas e machos que pudessem indicar a presença de cromossomos sexuais. Porém, alguns indivíduos do córrego da Cascatinha apresentaram um cromossomo supranumerário, metacêntrico, de tamanho similar ao maior par do complemento A e um indivíduo, da mesma localidade, apresentou dois cromossomos supranumerários do tipo metacêntrico grande.

Entre os 73 exemplares do córrego da Cascatinha analisados, todos apresentaram a fórmula cariotípica padrão para a espécie, identificada por (6m, 16sm, 14st, 14a) (Figura 1). Entretanto, foram encontrados 22 exemplares com um cromossomo supranumerário (Figura 7), além de um indivíduo portador de dois cromossomos B (Figura 8) nesta população, com este cromossomo extra presente em maior frequência nas fêmeas. Entre os indivíduos analisados (39 fêmeas e 34 machos), 28 fêmeas e 9 machos apresentaram cromossomo B. Esta diferença na frequência dos cromossomos supranumerários foi

observada a partir do mês de junho de 2008, sendo que nas amostras analisadas de julho de 2006 a dezembro de 2007, a frequência encontrada foi proporcional para machos e fêmeas. Porto-Foresti *et al.*, (1997), analisando exemplares de *A. scabripinnis* de três diferentes trechos do córrego da Cascatinha, SP, o mesmo citado anteriormente, observaram significativa diferença na frequência de cromossomo B, quando comparada ao sexo dos animais, sendo que 57,1% das fêmeas e apenas 8,7% dos machos apresentavam cromossomo B. No entanto, Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993), observaram cromossomo B restritos a exemplares machos.

A variação na frequência dos cromossomos B também tem sido relatada nas populações, de acordo com a altitude. Porto-Foresti *et al.*, 1997 estudaram a frequência dos cromossomos supranumerários e a densidade populacional dessa espécie em três trechos consecutivos do córrego do Cascatinha (Botucatu, SP), tendo sido verificada maior frequência de cromossomos B nos indivíduos capturados nas regiões mais elevadas. Estudos realizados por Neo *et al.* (2000) em três populações de *A. scabripinnis* que ocorrem em diferentes altitudes ao longo de um mesmo riacho, identificaram a presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920m e 1800m) e sua ausência na população de 700m. Os autores concordaram que o modelo encontrado seria melhor interpretado sob a luz da teoria parasítica de evolução de cromossomos B, segundo o qual esses elementos seriam mais frequentes em condições ambientais mais favoráveis para a espécie.

Na população do córrego do Cintra foi encontrado o padrão cariótipo de (6m, 20sm, 14st, 10a) (Figura 2) em indivíduos de ambos os sexos. Na amostra analisada, que constou de 52 exemplares (29 fêmeas e 23 machos), não foram encontrados indivíduos portadores de cromossomos supranumerários.

Os 17 exemplares da população do córrego da Estância Funari analisados (9 fêmeas e 8 machos) apresentaram a fórmula cromossômica (4m, 18sm, 16st, 12a) para indivíduos de ambos os sexos (Figura 3), não sendo observada também a presença portadores de cromossomos supranumerários nessa amostra.

Os 22 exemplares analisados da população do córrego Capão Bonito (10 fêmeas e 12 machos) apresentaram número diplóide de $2n=50$ cromossomos, de modo igual ao das demais populações, sem a presença de cromossomos supranumerários. A fórmula cariotípica apresentou-se como (6m, 16sm, 14st, 14a) em indivíduos de ambos os sexos (Figura 4).

As análises realizadas nos 09 exemplares provenientes da população do córrego Cachoeira do Barbosa (3 fêmeas e 6 machos) também apresentaram número diplóide de $2n=50$ cromossomos, sem a presença de cromossomos B. A fórmula cariotípica encontrada para indivíduos de ambos os sexos foi (6m, 16sm, 14st, 14a) (Figura 5).

Comparando os dados cariotípicos obtidos com os descritos na literatura, pode-se verificar que existem apenas algumas pequenas diferenças quanto aos cariótipos de *A. scabripinnis* com os demais já descritos. Essas diferenças podem refletir a existência de pequenos rearranjos que foram sendo fixados independentemente nas diversas populações, determinadas pelo isolamento das populações em estudo nos pequenos riachos componentes dos ambientes de cabeceira da bacia hidrográfica. Não pode ser descartado o fato de serem determinadas por diferenças decorrentes de erros na organização dos cariótipos.

O número diplóide das espécie podem variar principalmente devido a alterações cariotípicas do tipo fusões e/ou fissões cêntricas dos cromossomos. Estas alterações foram descritas por Maistro *et al.*, 2000 entre os indivíduos de uma população de *A. scabripinnis*

do córrego Tamanduá-SP, onde foram observados dois números diplóides, $2n=48$ ($6m+28sm+4st+10a$) e $2n=50$ cromossomos ($6m+26sm+4st+14a$) caracterizando-se em dois citótipos diferentes. Frente a estas diferenças observadas em indivíduos da mesma população, os autores propuseram que os animais analisados teriam um ancestral comum e que a melhor hipótese para explicar essa diferença seria a ocorrência de translocação Robertsoniana entre dois pares de cromossomos acrocêntricos de um indivíduo com 50 cromossomos. No presente trabalho, todas as populações analisadas apresentaram igual número diplóide de $2n=50$ cromossomos, coincidindo com o número diplóide mais comum encontrado para esta espécie e mostrando diferenciações determinadas por rearranjos internos, provavelmente inversões, sem modificar o número diplóide.

O bandamento C, técnica amplamente utilizada em estudos citogenéticos de peixes (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Margarido e Galetti Jr., 1999; Mantovani *et al.*, 2004), permite identificar a distribuição da heterocromatina constitutiva ao longo dos cromossomos e tem sido aplicada na identificação de polimorfismos cromossômicos (Molina, 1995), na identificação de cromossomos sexuais (Galetti & Foresti, 1986; Andreatta *et al.*, 1992; entre outros) e para caracterizar espécies ou grupos de espécies (Galetti *et al.*, 1991; Margarido & Galetti, 1996, entre outros).

Entre os peixes, há uma tendência para a presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos (Almeida-Toledo *et al.*, 1981; Gold *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Foresti *et al.*, 1989) e Dergan & Bertollo (1990) indicam que há uma predominância de bandas C pericentroméricas entre os Characiformes. Entretanto, Foresti *et al.* (1989) não consideram a existência de tendência que indique localização preferencial de bandas C entre as espécies de família Characidae. Reforçando esta hipótese, verifica-se que *Astyanax scabripinnis* apresenta predominância de bandas heterocromáticas teloméricas (Moreira-

Filho e Bertollo, 1991; Maistro *et al.*, 1992), enquanto em *Moenkhausia santafilomenae*, blocos de heterocromatina intersticial estão presentes em vários cromossomos.

O emprego da metodologia proposta por Sumner (1972) para identificar a heterocromatina constitutiva, além de auxiliar no pareamento de cromossomos homólogos, também permite a identificação de rearranjos cromossômicos e eventos estruturais do genoma que contribuem com informações de interesse para estudos da evolução cariotípica das espécies de um grupo taxonômico. Em *A. scabripinnis*, esta se apresenta localizada preferencialmente na região pericentromérica da maioria dos cromossomos e, predominantemente, em blocos (grandes ou pequenos) na região telomérica de alguns cromossomos dos grupos de subtelocêntrico e/ou acrocêntrico (Maistro *et al.*, 1994; Souza e Moreira –Filho, 1995; Mizoguchi e Martins- Santos, 1998; Maistro *et al.*, 2000). No presente trabalho, blocos de heterocromatina constitutiva foram identificados em posição terminal em alguns cromossomos do complemento, nos exemplares das populações analisadas de *Astyanax scabripinnis*. Na amostra do córrego da Cascatinha, todos os indivíduos apresentaram blocos heterocromáticos na região terminal do braço longo de 4 pares de cromossomos, sendo 3 pares de cromossomos do tipo acrocêntrico e 1 par de cromossomos do tipo subtelocêntrico (Figura 6). Os indivíduos com $2n=51$ (com 1 B) apresentaram, além dos blocos heterocromáticos presentes no cariótipo padrão, um cromossomo B totalmente heterocromático, de uma coloração diferenciada do padrão observado nos cromossomos do complemento A (Figura 7). O indivíduo com $2n=52$ cromossomos (02 Bs) apresentou marcações banda C positivas em 5 pares cromossômicos, sendo 3 pares de cromossomos acrocêntricos e 2 pares de cromossomos subtelocêntricos (Figura 8).

Quando a mesma técnica foi utilizada nos exemplares do córrego do Cintra, foram observados pequenos blocos heterocromáticos na região terminal do braço longo de 5 pares

de cromossomos acrocêntricos (Figuras 9a e b). Nos exemplares do córrego da Estância Funari foi possível observar marcação na região terminal de diversos cromossomos, tanto no braço curto como no braço longo (Figuras 10a e b) e nos indivíduos da população do córrego Capão Bonito, pequenos blocos de heterocromatina constitutiva foram marcadas a região centromérica de diversos cromossomos do complemento (Figuras 11a e b). Já nos indivíduos do córrego Cachoeira do Barbosa, os cromossomos apresentaram, além de pequenos blocos heterocromáticos na região centromérica de diversos cromossomos, também marcações na região terminal do braço longo de alguns pares cromossômicos (pares 6, 12, 13, 19 e 20) (Figuras 12a e b).

Uma grande diversidade na forma dos blocos heterocromáticos foi observada entre as populações analisadas. Nos indivíduos provenientes de localidades da bacia hidrográfica do Rio Tietê, a grande maioria dos cariótipos apresentou marcações nos maiores pares cromossômicos subtelocêntricos e na maioria dos cromossomos acrocêntricos. Contudo, nas duas populações pertencentes à bacia do Rio Paranapanema os indivíduos apresentaram marcações centroméricas. Esta diversidade e variabilidade apresenta-se como uma ocorrência comum neste grupo de organismos e parece reforçar a hipótese da existência de um complexo de espécies, como postulado por Moreira-Filho e Bertollo (1991).

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) constituem excelentes marcadores citotaxonômicos, podendo ser utilizadas em propostas de filogenia em certos grupos. Em peixes, o número e/ou a localização das RONs foram descritos para cerca de 231 espécies, sendo que 164 (71%) apresentaram RONs simples, 35 (15%) apresentaram 2 pares de cromossomos nucleolares e 32 (14%) apresentaram mais de 2 pares de cromossomos portadores de RONs (Oliveira & Foresti, 1994).

Algumas subfamílias de Characidae podem ser caracterizados por apresentarem RONS simples, como *Bryconinae* (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Margarido e Galetti Jr., 1996) ou múltiplas como *Serrasalminae* (Galetti Jr., Silva e Cerminaro, 1985b). As RONS podem ser simples, presentes em um par cromossômico, ou múltiplas, presentes em mais de um par de cromossomos. No gênero *Astyanax* foram descritos vários sistemas de RONS múltiplas (Pfister e Moreira-Filho, 1997; Pastori *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 1998; Robaina *et al.*, 1998). Para a espécie *A. scabripinnis*, Rocon stange e Almeida- Toledo (1993) observaram de um a 15 cromossomos com marcações pelo nitrato de Prata. Nos exemplares no córrego da Cascatinha (Figura 6) foram evidenciadas marcações freqüentes na região terminal do braço curto de 3 cromossomos do tipo submetacêntrico, sendo constante nos cromossomos do par 11. Nos exemplares do córrego do Cintra, as regiões organizadoras de nucléolos (RONS) foram localizadas na porção telomérica do braço curto em um par cromossômico do tipo submetacêntrico, sendo constantes nos cromossomos do par 12 (Figura 13). Os indivíduos provenientes da amostra do córrego da Estância Funari apresentaram marcações na região intersticial de cromossomos dos tipos submeta e subtlocêntricos, de números 5, 10 e 13, além de marcações terminais do braço longo dos cromossomo dos pares 10 e 18 (Figura 14).

Tais evidências parecem ser comuns no processo de modificações cariotípica entre os peixes, uma vez que envolvem regiões de DNA repetitivo, que apresentam características específicas de dispersão nos conjuntos cromossômicos das espécies. Tais particularidades parecem ser determinadas por eventos de permuta desigual ou de duplicações, modificando a quantidade de sequências repetidas nos cromossomos. Em outros Characidae, como em Cynopotaminae (Falcão & Bertollo, 1985), Triporteinae (Falcão, 1988; Bertollo & Cavallaro, 1992) e Serrasalminae (Galetti *et al.*, 1985b; Cestari & Galetti, 1992a,b; Martins-Santos *et al.*, 1994, Cestari, 1996) também foram detectadas

RONs múltiplas. Outra espécie de Characidae, pertencente a subfamília Tetragonopterinae, *Tetragonopterus chalceus* (Portella *et al.*, 1988) também apresenta mais de um par de cromossomos portadores de RONs.

A caracterização da RONs em posição intersticial merece maior destaque, pois envolve a ocorrência de modificação cromossômicas determinantes da diversificação cariotípica das populações. Nos indivíduos do córrego Capão Bonito, a marcação ocorreu em um par cromossômico (par 5), ou seja, RON simples, detectada na região terminal do braço menor (Figura 15). Por outro lado, nos indivíduos do córrego Cachoeira do Barbosa, que também apresentaram RONs simples, as marcações foram evidenciadas na região terminal do braço curto no par 8 (Figura 16). Supõe-se que eventos secundários de modificação cromossômica, como inversões, devem ter ocorrido neste segmento cromossômico, determinando o reposicionamento desta região nucleolar.

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 estiveram ativas na interfase precedente (Miller *et al.* 1976). Entretanto, estas regiões também podem ser evidenciadas, independentemente de sua atividade transcricional, com o uso de corantes fluorescentes como a cromomicina (CMA₃) e a mitramicina (MM), específicos para segmentos ricos em bases GC (Howell, 1982; Schimid *et al.* 1982; Rocchi, 1982; Satya-Prakash & Pathak, 1984; entre outros). Nas populações de *Astyanax scabripinnis* analisadas, a coloração com o fluorocromo CMA₃ identificou segmentos marcados nos mesmos cromossomos envolvidos com as RONs (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21). Esta correspondência entre as regiões de RONs e CMA₃ positivas indica uma composição rica em bases GC nas regiões das RONs, provavelmente presentes nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre sequências de DNA repetitivo adjacentes (Schimid, 1980). Contudo, este tipo de

abordagem deve ser feito com ressalvas, visto que podem ocorrer regiões cromossômicas igualmente ricas em GC sem correspondência com as RONS (Artoni *et al.* 1999). No presente estudo as marcações foram coincidentes com as RONS nas preparações dos indivíduos das cinco localidades estudadas. Os fluorocromos como a Cromomicina vêm sendo bastante utilizados nos estudo citogenéticos de peixes uma vez que, além de apresentam uma notável relação com as regiões nucleolares (Souza, Moreira-Filho, Bertollo, 1995), também identificam regiões GC específicas.

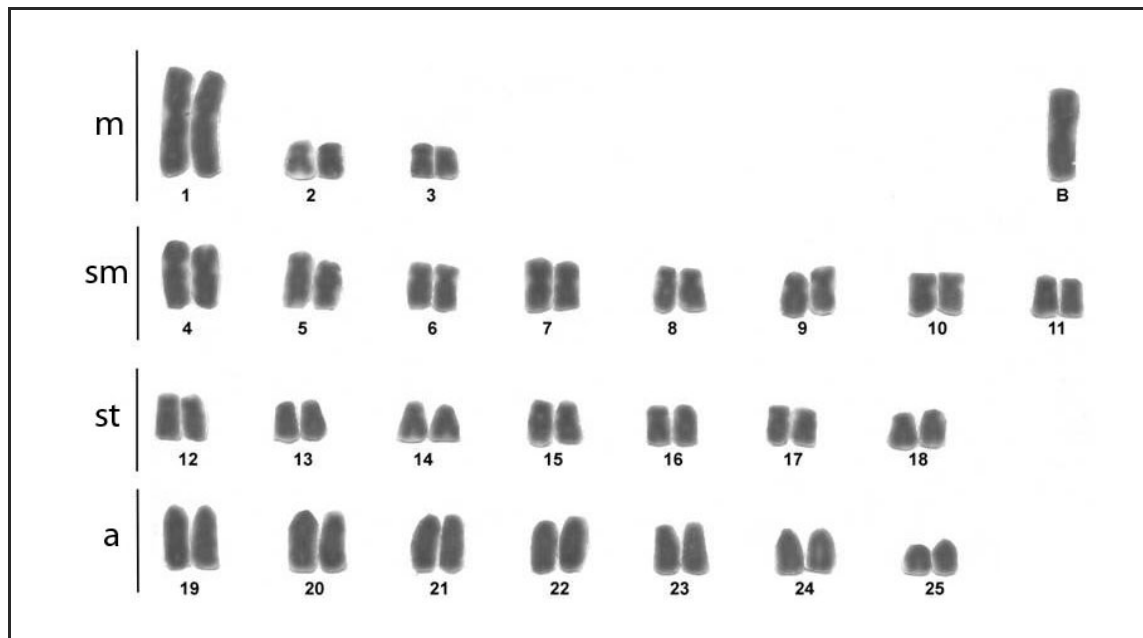


Fig.1 : Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do Córrego da Cascatinha. O cromossomo B está em destaque.

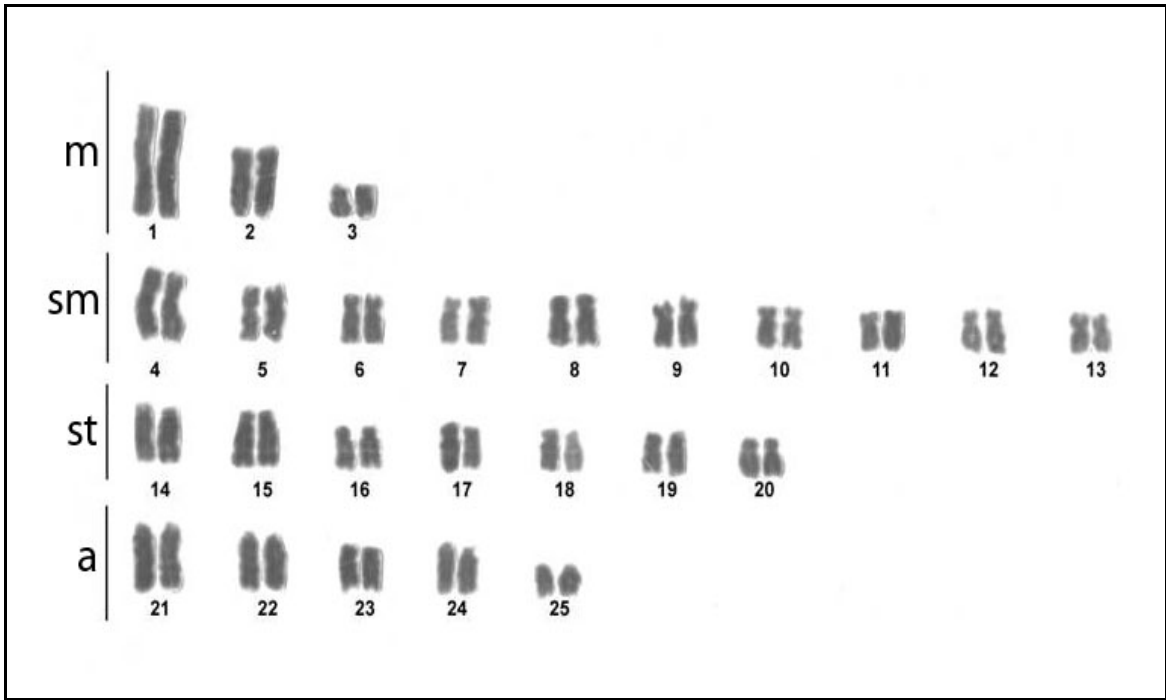


Fig. 2: Cariótipo de exemplar diplóide de *Astyanax scabripinnis* do Córrego do Cintra.

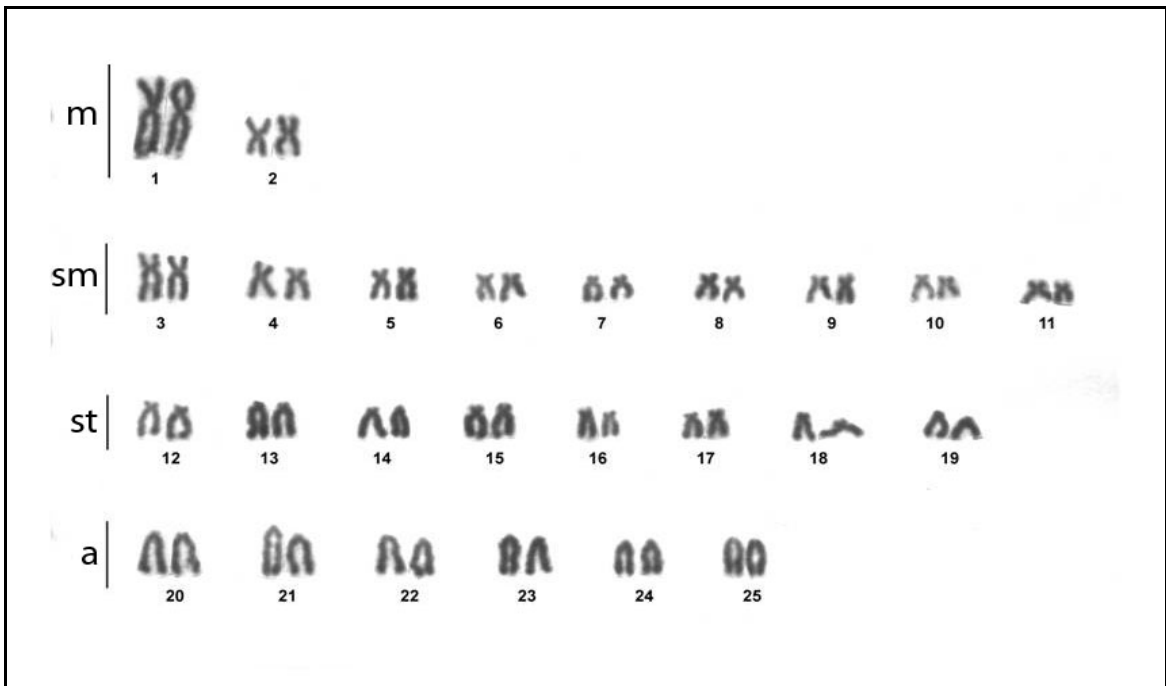


Fig. 3: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do Córrego da Estância Funari.

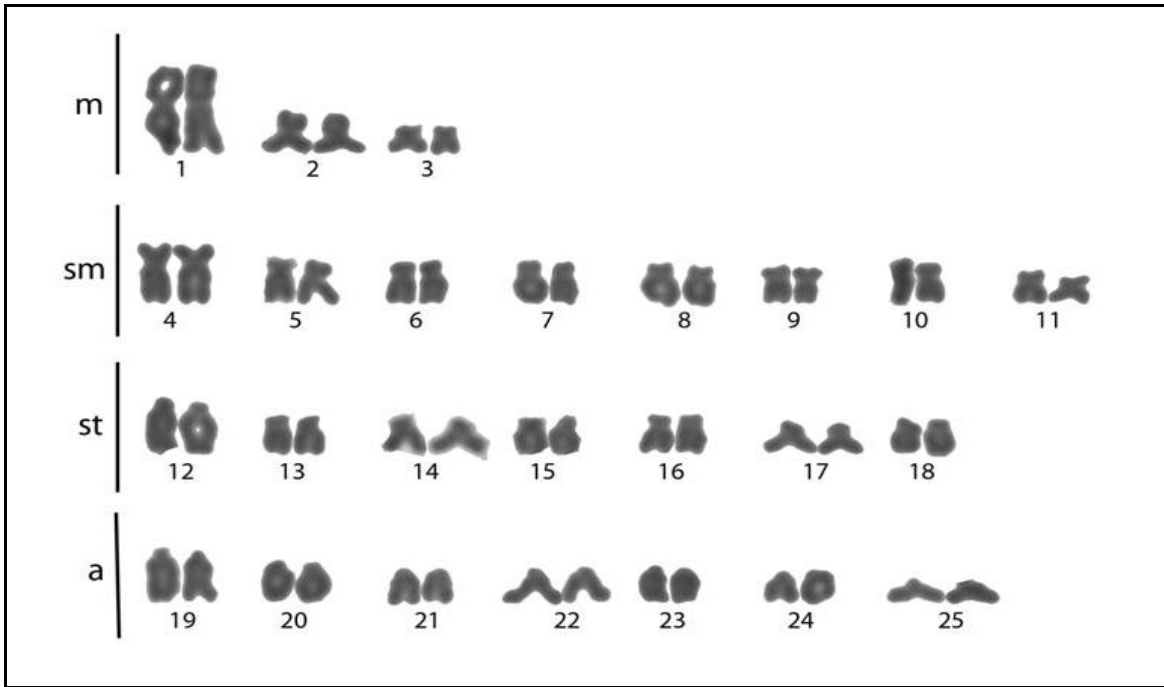


Fig. 4: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* coletado no córrego Capão Bonito.

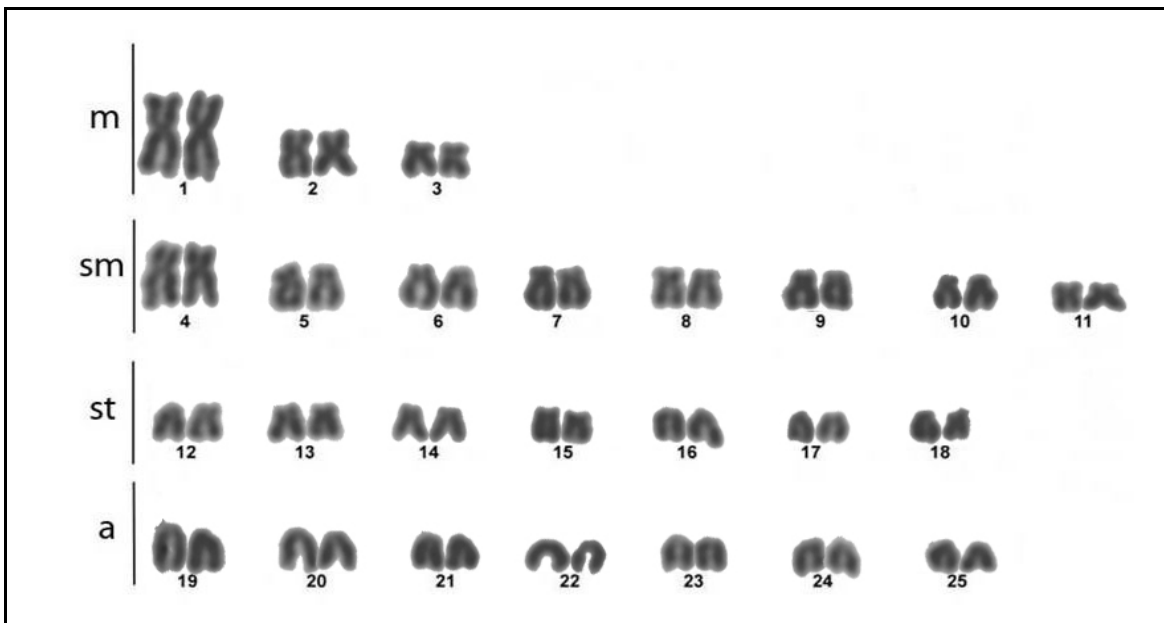


Fig 5: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* coletado no córrego Cachoeira do Barbosa.

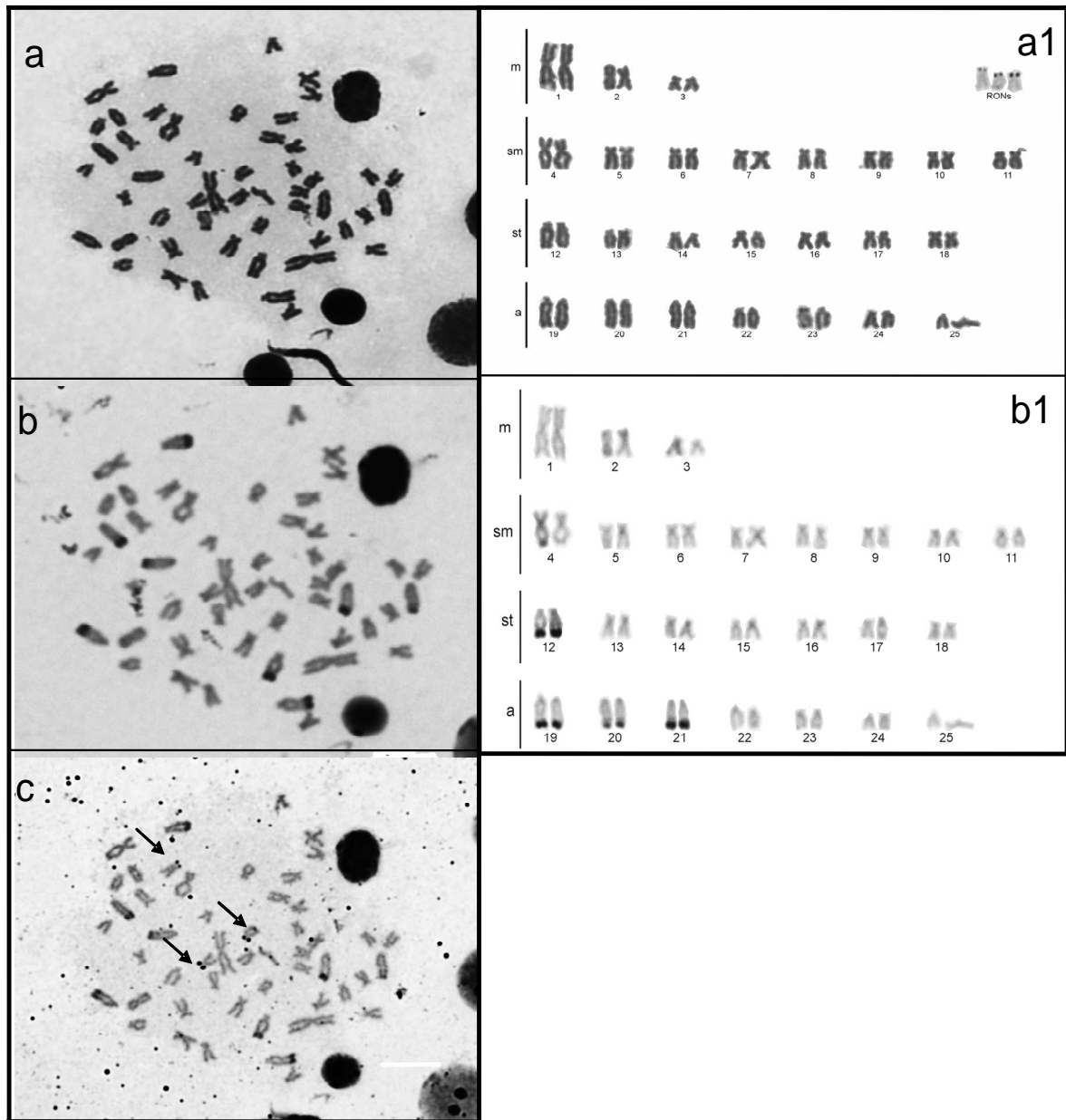


Fig. 6: Metáfases somáticas de exemplar de *Astyanax scabripinnis* com $2n=50$ do córrego da Cascatinha, submetidas à coloração sequencial: (a) metáfase somática submetida a coloração convencional por Giemsa; (a1) montagem do cariótipo; no detalhe, os cromossomos portadores de RONS; (b) metáfase somática evidenciando o padrão de heterocromática constitutiva; (b1) cariótipo da metáfase submetida ao bandamento C; (c) metáfase somática evidenciando os cromossomos com as marcações das RONS.

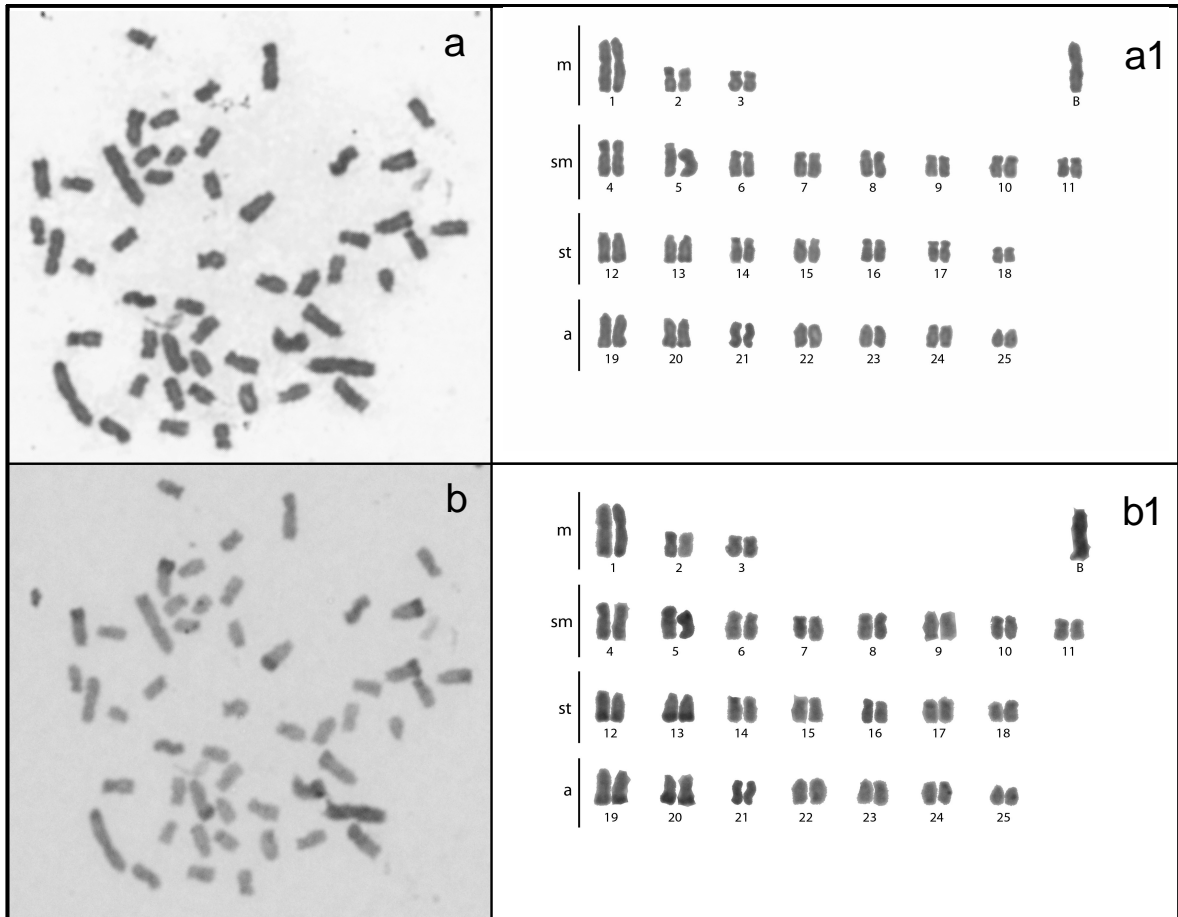


Fig. 7: Metáfases somáticas de exemplar de *Astyanax scabripinnis* com $2n=51$ do córrego da Cascatinha: (a) metáfase somática submetida a coloração convencional por Giemsa; (a1) cariótipo mostrando no detalhe o cromossomo supranumerário; (b) metáfase somática evidenciando o padrão de heterocromática constitutiva pelo bandamento C; (b1) cariótipo mostrando os pares cromossômicos com regiões heterocromáticas.

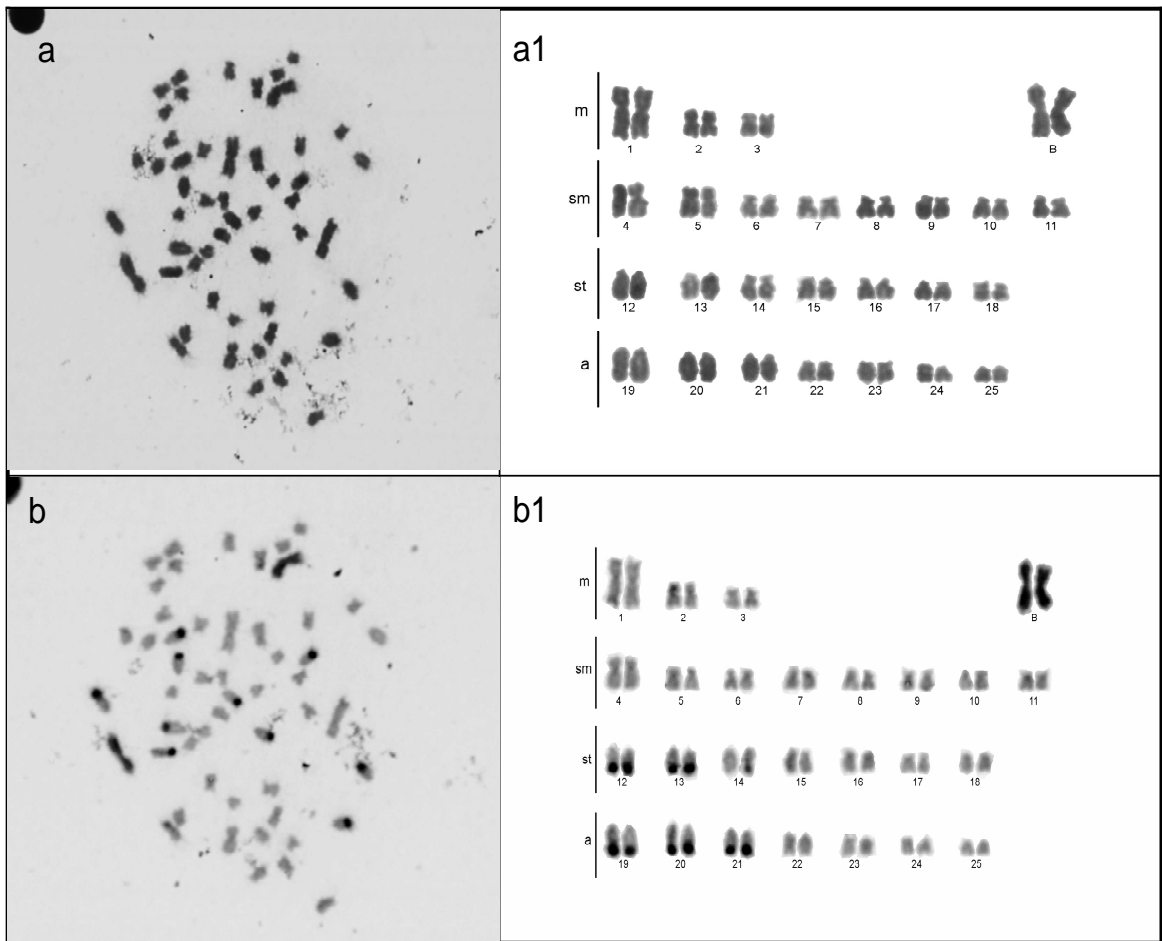


Fig. 8: Metáfases somáticas e cariótipos de um indivíduo de *Astyanax scabripinnis* com $2n=52$ do córrego do Cascatinha, submetidos à coloração convencional com Giemsa (a e a1) e à técnica de bandamento C (b e b1). Notar os blocos evidentes na região terminal de 5 pares cromossômico e os cromossomos supranumerários totalmente heterocromáticos (2B).



Fig. 9a: Metáfase somática de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cintra, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.

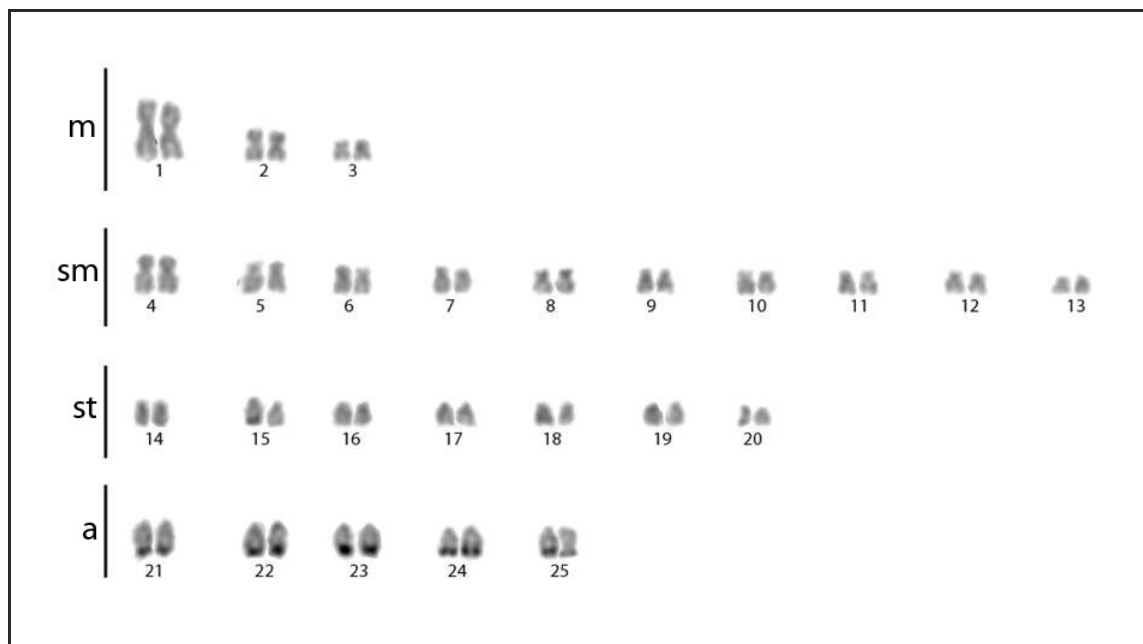


Fig. 9b: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do Córrego do Cintra, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.



Fig. 10a: Metáfase somática de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego da Estância Funari, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.

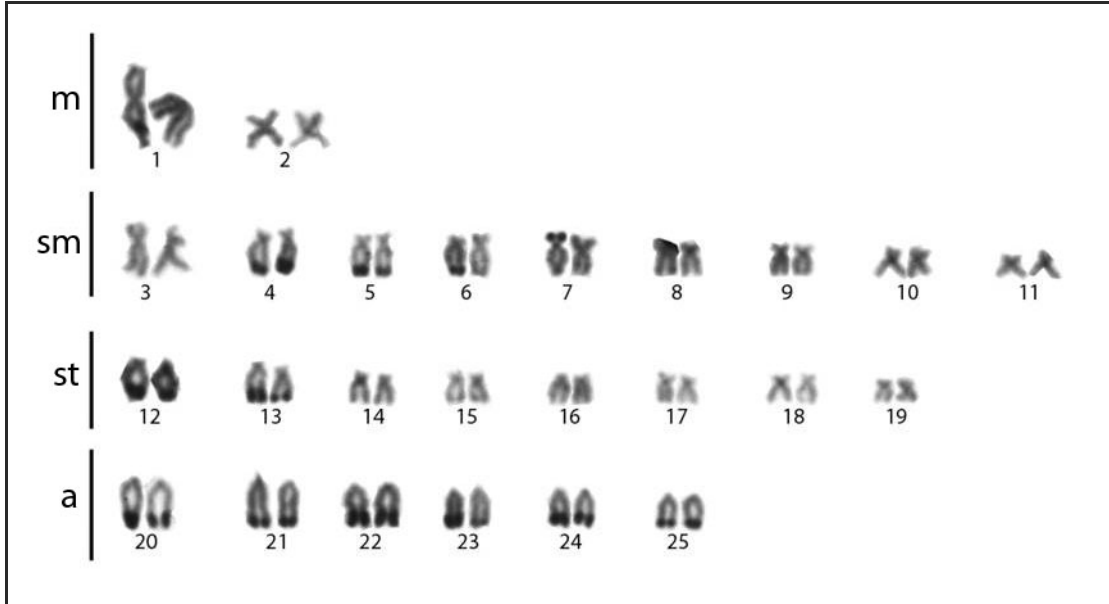


Fig. 10b: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego da Estância Funari, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.



Fig. 11a: Metáfase somática de exemplar de *Astyanax scabripinnis* coletado no córrego Capão Bonito, evidenciando blocos heterocromático localizados principalmente nas regiões dos centrômeros.

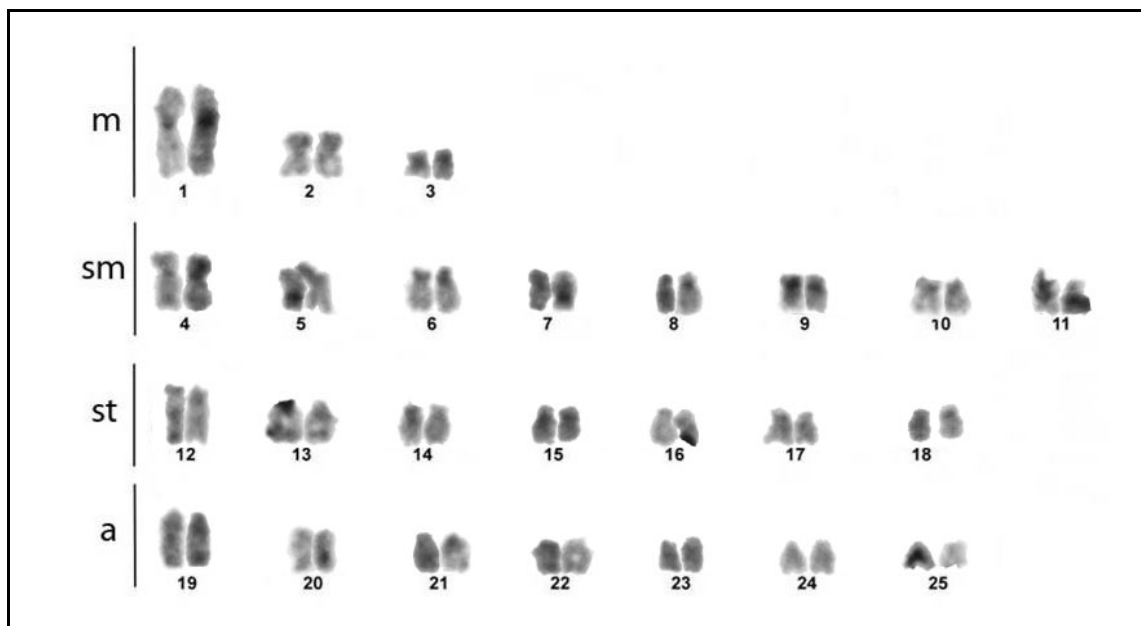


Fig. 11b: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Capão Bonito, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.

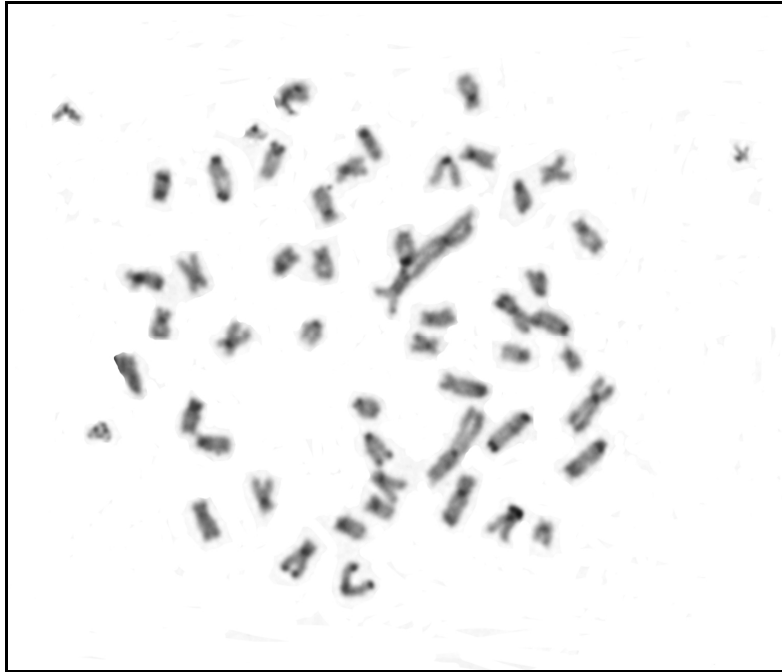


Fig. 12a: Metáfase somática de exemplar de *Astyanax scabripinnis* coletado no córrego Cachoeira do Barbosa, evidenciando os blocos heterocromático localizados nas regiões centroméricas e também nas regiões teloméricas dos cromossomos.

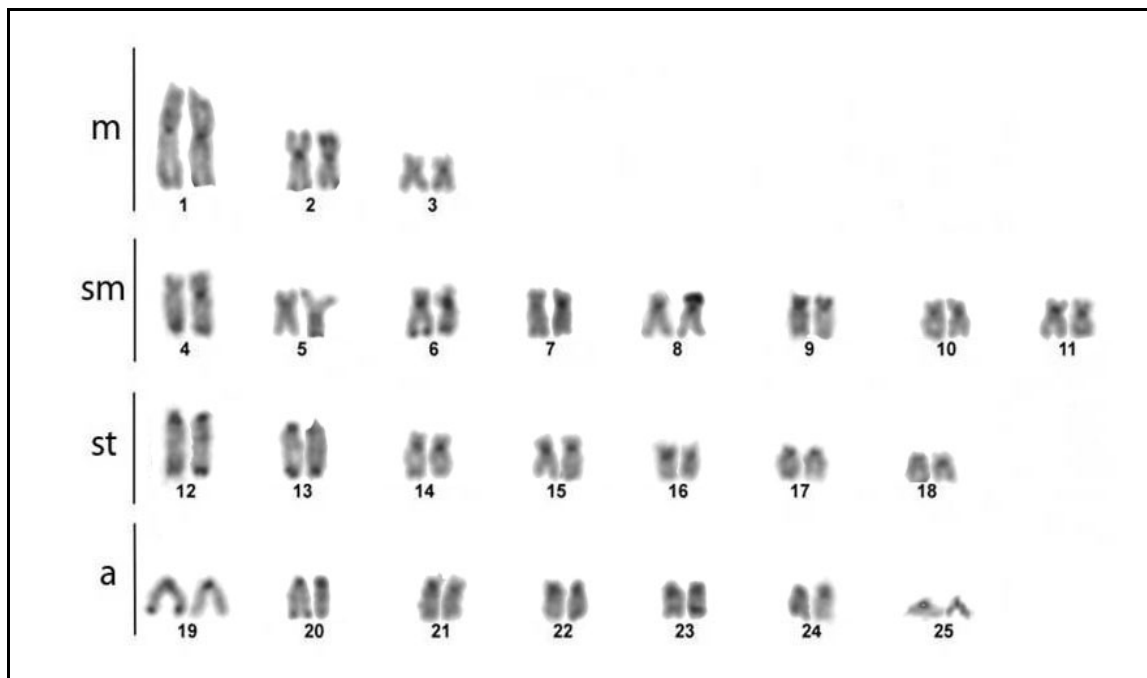


Fig. 12b: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cachoeira do Barbosa, evidenciando o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva.

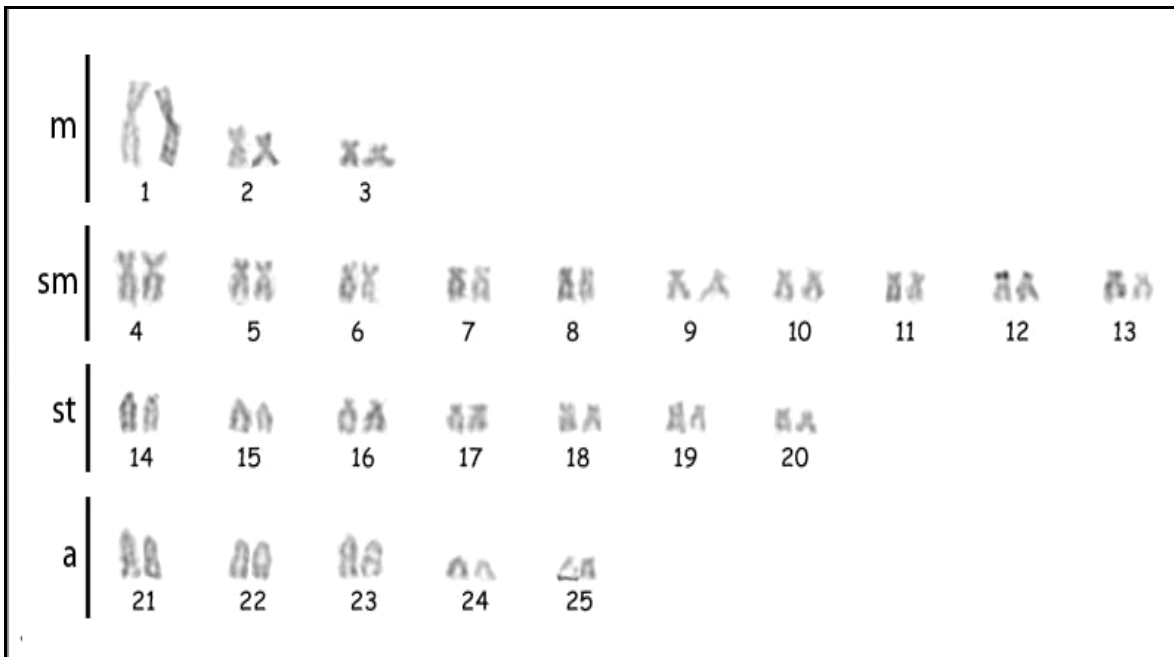


Fig. 13: Cariótipo de exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cintra, evidenciando as Ag-RONs (cromossomos do par 12).

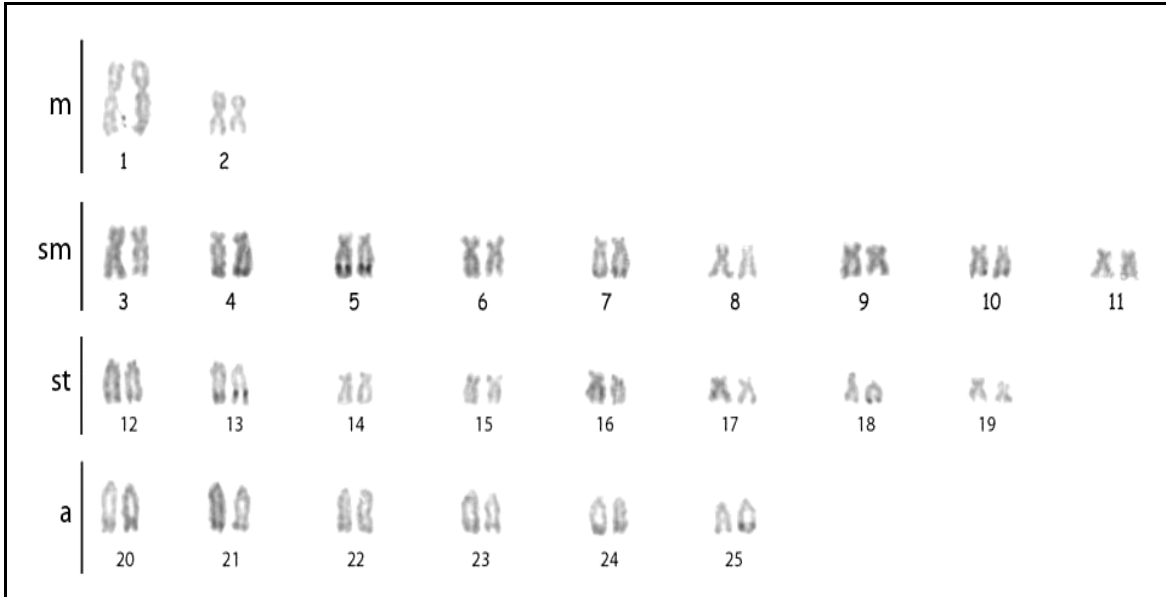


Fig. 14: Cariótipo um exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego da Estância Funari, evidenciando as Ag-RONs nos pares 5 , 10 e 13.



Fig. 15: Cariótipo um exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego Capão Bonito, evidenciando as Ag-RONs no par 5.

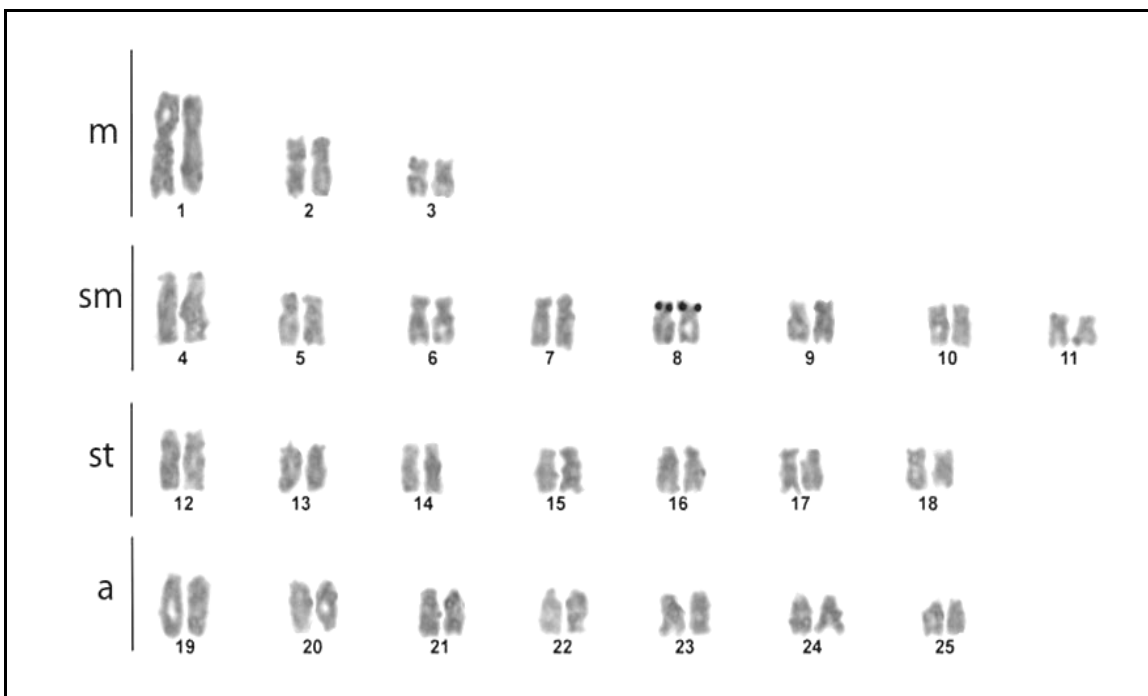


Fig. 16: Cariótipo um exemplar de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cachoeira do Barbosa, evidenciando as Ag-RONs no par 8.

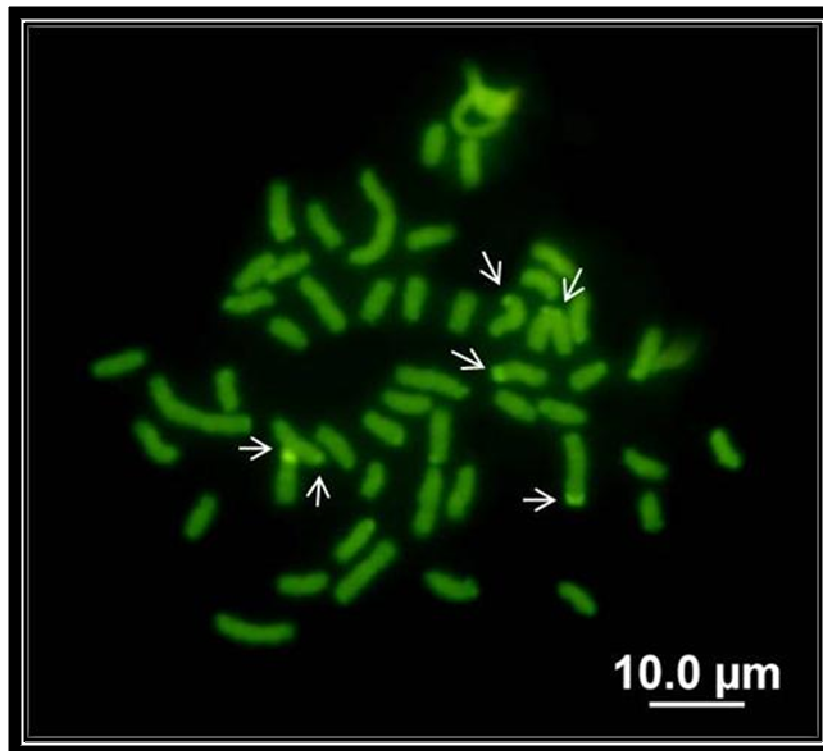


Fig. 17: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cascatinha, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA3). As setas indicam os sítios GC-positivos.

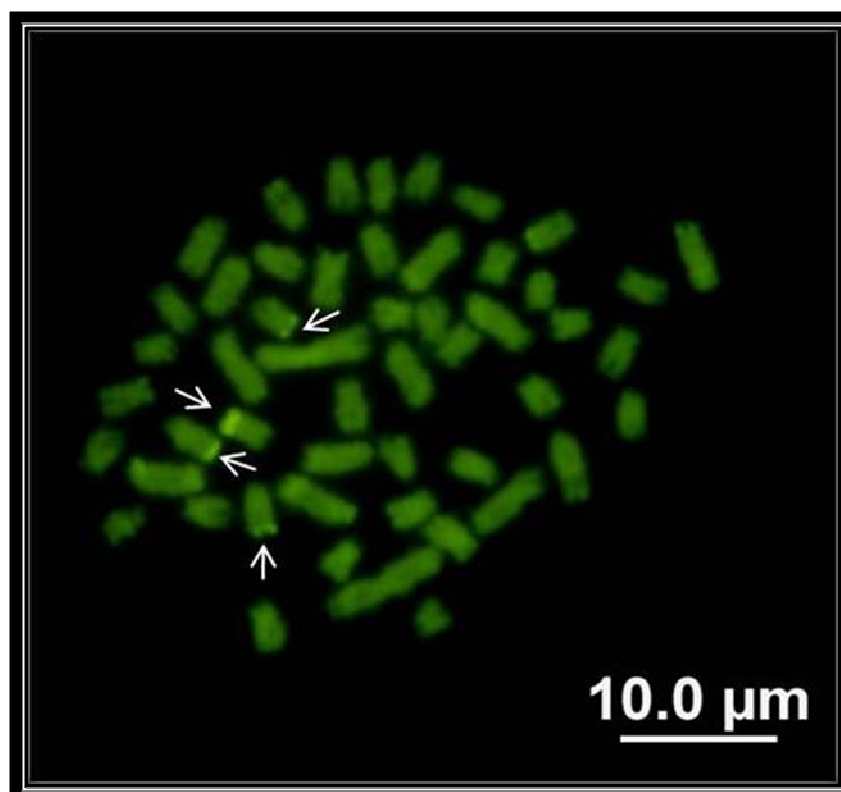


Fig. 18: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cintra, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA3). As setas indicam os sítios GC-positivos.

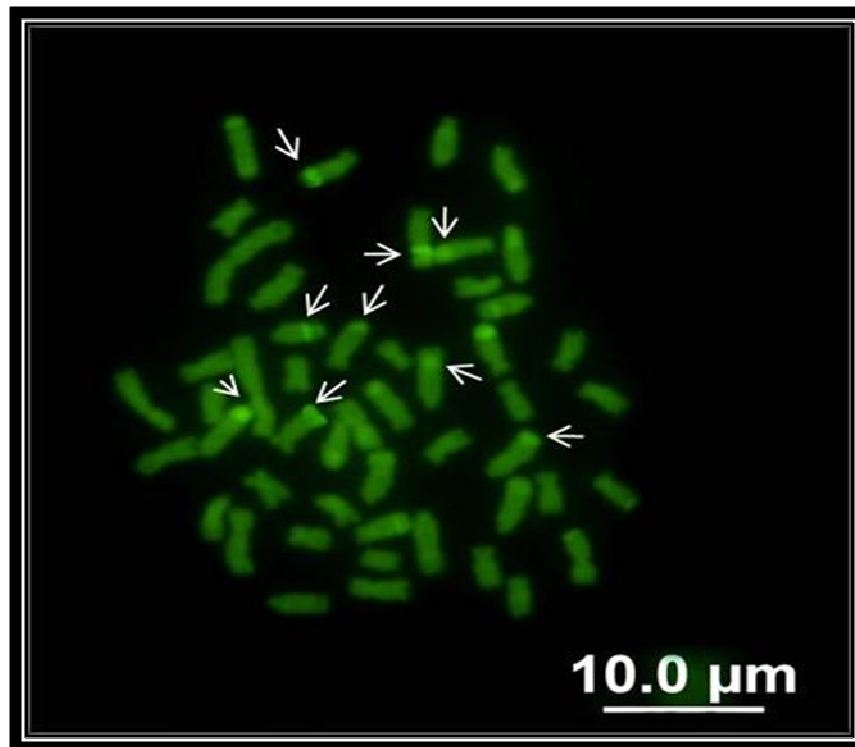


Fig. 19: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego da Estância Funari, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA3). As setas indicam os sítios GC-positivos.

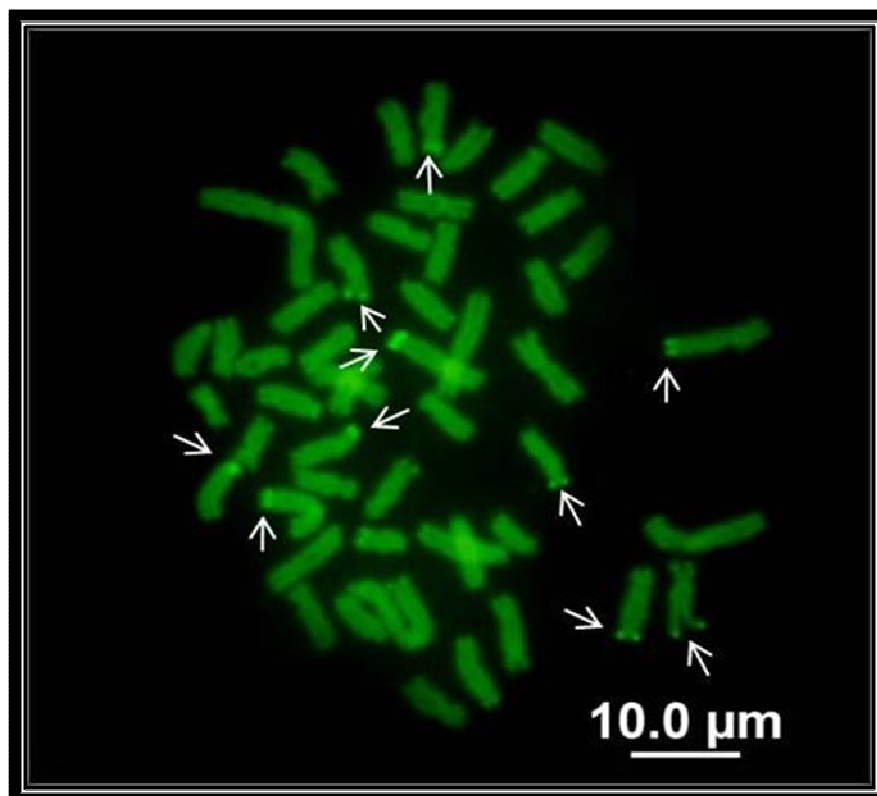


Fig. 20: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego Capão Bonito, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA3). As setas indicam os sítios GC-positivos.

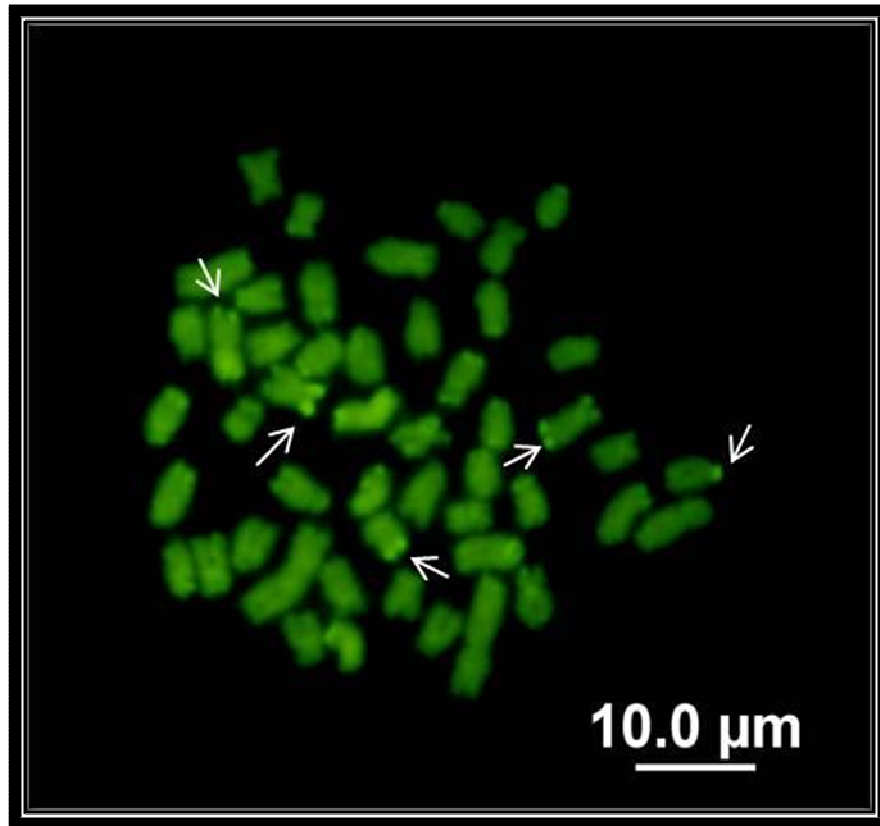


Fig. 21: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cachoeira do Barbosa, tratada com o fluorocromo Cromomicina (CMA3). As setas indicam os sítios GC-positivos.

CAPÍTULO II

Mapeamento gênico de sítios repetitivos de DNAr 5s e 18S em *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae)

RESUMO

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* nos cromossomos de *Astyanax scabripinnis* utilizando 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, tem permitido reforçar a importância destes segmentos como marcadores interessantes para o estudo das relações entre espécies de peixes. No presente estudo foi realizado o mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S em representantes de quatro populações de *Astyanax scabripinnis*, de ocorrência nas bacias hidrográficas dos rio Tietê e Paranapanema. As análises das preparações cromossômicas realizadas revelaram o mesmo número diplóide de $2n=50$ cromossomos para os indivíduos das quatro populações e quando as sondas de DNAr 5S e 18S foram submetidas à hibridação *in situ* fluorescente, verificou-se a presença de segmentos de DNAr 5S em um par cromossômico nos indivíduos de todas as localidades, enquanto que a sonda de DNAr 18S apresentou posições diferenciadas nos indivíduos nas diferentes localidades. Nas amostras dos córregos Cascatinha e Cachoeira do Barbosa, foram identificadas quatro marcações e as dos córregos da Estância Funari e Capão Bonito revelaram seis cromossomos marcados. Estes genes apresentaram-se em sintonia em apenas um cromossomo no cariótipo dos exemplares provenientes da amostra do córrego do Cachoeira do Barbosa. Os dados obtidos, além de revelarem aspectos citogenéticos desta espécie, podem também ser utilizados em interpretações evolutivas, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos nas modificações da estrutura cariotípica dos indivíduos e populações. Além disso, podem também auxiliar na compreensão das relações entre as espécies deste grupo.

INTRODUÇÃO

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado que as sequências de DNA e genes podem ser muitos úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, além da grande possibilidade de sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcadores citogenéticos entre diferentes espécies. Embora nas duas últimas décadas estudos citogenéticos tenham sido realizados em um grande número de espécies de peixes, tais análises foram principalmente direcionadas para conhecimentos básicos da estrutura cariotípica e poucos trabalhos foram realizados visando à caracterização e mapeamento cromossômico.

Marcadores citogenéticos e genéticos baseados no DNA têm sido desenvolvidos principalmente para emprego na aquicultura, com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. De modo extensivo e principalmente a partir das últimas décadas, marcadores citogenéticos e citogenético-moleculares vêm sendo utilizados para a construção de mapas genéticos, que podem oferecer benefícios particulares tanto para a aquicultura, especialmente para a identificação de estoques, análises de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações, quanto na proposição de conhecimentos básicos da estrutura cromossômica e do cariótipo das espécies. Assim, os mapas genéticos têm se apresentado como ferramentas importantes também para estudos comportamentais, morfológicos, filogeográficos e evolutivos, entre outros.

O estudo de sequências repetitivas de DNA tem se mostrado útil no esclarecimento de inúmeras questões, incluindo a estrutura de regiões centroméricas e

teloméricas, origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos B, e evolução do genoma como um todo. As sequências repetitivas de DNA podem encontrar aplicação também no mapeamento físico do genoma, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos de importância significativa na biologia básica e aplicada das espécies. E, neste contexto, a construção e integração de mapas físicos e genéticos representam a melhor estratégia para o entendimento da estrutura e evolução do genoma de diversas espécies.

Os primeiros estudos citogenéticos em exemplares de *A. scabripinnis* foram realizados por Moreira-Filho *et al.* (1978), em representantes de uma população existente no ribeirão do Bicudos (Brotas/SP), que apresentaram um número diplóide $2n=50$ cromossomos. Desde então, diversos trabalhos abordando aspectos estruturais dos cariótipos e cromossomos desta espécie têm contribuído com informações para o conhecimento das relações entre os componentes deste grupo de organismos.

Nesse sentido, a realização do mapeamento genômico de indivíduos de diferentes populações de *A. scabripinnis*, realizado com base na localização e dispersão de sítios repetitivos dos genes ribossomais 5S e 18S, poderão fornecer informações sobre a dinâmica destes genes nos cariótipos e sobre os mecanismos de diversificação cromossômica nesta espécie, contribuindo para estudos filogenéticos e evolutivos neste grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares coletados foram previamente identificados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu. Foram analisados 173 exemplares da

espécie *Astyanax scabripinnis* coletados em diferentes localidades do Estado de São Paulo, em componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema.

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada a técnica de estimulação da divisão celular, que compreende a injeção prévia de 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 para peixes por Oliveira *et al.* (1988).

A técnica utilizada para a obtenção de preparações cromossômicas para a análise citogenética foi realizada a partir de fragmentos de tecido renal, em células obtidas da parte anterior do rim, conforme descrito por Foresti *et al.* (1981), com algumas adaptações.

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com procedimentos descritos por Pinkel *et al.* (1986), com modificações, utilizando sondas obtidas de sequências de DNA 5S da espécie *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr, 1999) e de DNAr 18S da espécie *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004). A sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina. A sonda 18S foi marcada com biotina 14-dATP por nick translation, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e a amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotinilado. A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com procedimentos descritos por Pinkel *et al.* (1986) com adaptações, utilizando as sondas obtidas, sendo os cromossomos metafásicos contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) equipado para fluorescência.

As imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

RESULTADOS E DICUSSÃO

Considerada componente de um complexo de espécie denominado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) de “complexo *scabripinnis*”, a espécie *Astyanax scabripinnis* apresenta grande diversidade morfológica e cariotípica. Estudos realizados por Mizoguchi & Martins-Santos (1998) em quatro populações da bacia do Rio Paraná e por Maistro *et al.* (1998) em nove populações das sub-bacias dos rios Paranapanema, Pardo e Tietê permitiram caracterizar as diferentes populações por análises citogenéticas e morfométricas, confirmando a hipótese do “complexo *scabripinnis*”. Considerando suas características biológicas, associadas a dados morfológicos, esta espécie como um modelo de estudo para os citogeneticistas, sendo atualmente um dos grupos de peixes mais estudados da ictiofauna neotropical, do ponto de vista citogenético.

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado que as sequências de DNA e genes podem ser muitos úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, além da sua localização nos cromossomos possibilitar sua utilização como elementos de marcação específica para diferentes espécies.

Os primeiros estudos com genomas completamente seqüenciados foram focados nas sequências de cópia única ou com pequeno número de cópias. Pouca atenção foi dada, até então, aos DNA repetitivos e segmentos duplicados. Na maioria dos organismos, as sequências repetitivas compreendem uma grande porção do genoma,

sendo que em cebola estas representam cerca de 95% do genoma (Flavell *et al.*, 1974) e em humanos 50% ou mais do genoma (The Genome International Sequencing Consortium, 2001). A variação no tamanho do genoma de diferentes eucariotos é frequentemente associada a diferenças na quantidade de sequências repetitivas (Kidwell, 2002). A fim de se obter um melhor esclarecimento sobre a localização e a quantidade exata de cístrons ribossômicos, foi realizada a técnica de hibridação *in situ* (FISH) com a utilização da sonda de DNAr 18S. Esta técnica vem se mostrando uma ferramenta bastante utilizada na detecção e mapeamento das RONS ao longo do complemento cromossômico, pois podem identificá-las independentemente da sua atividade durante a interfase (Peres, 2005).

A hibridação *in situ* na espécie *Astyanax scabripinnis* confirmou a presença de DNAr 18S coincidente com as Ag-RONs em todas as localidades. Porém, nos exemplares da população do córrego do Cascatinha, foram detectadas quatro marcações na região terminal do braço curto dos cromossomos (Figura 1); quando a mesma sonda foi utilizada na população do córrego da Estância Funari, foi possível observar seis marcações, quatro delas localizadas visivelmente nas regiões intersticiais dos braços cromossômicos, sendo que as demais marcações se mostram na região telomérica do braço longo, coincidentes com as posições identificadas pela impregnação por Prata (Figura 2).

A ocorrência de um número maior de sítios identificados pela hibridação *in situ* pela sonda de DNAr 18S que aqueles identificados pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, é relativamente comum em peixes, como observado em diferentes espécies como *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000), *Astyanax scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Kavalco e Moreira-Filho, 2003) e *Prochilodus lineatus* (Jesus e Moreira-Filho, 2003), entre outras. Nos exemplares do córrego Capão Bonito, a

hibridação *in situ* de DNAr com a sonda 18S se mostrou presente em seis cromossomos, sendo duas marcações identificadas na região terminal do braço curto e as outras quatro marcações na porção telomérica do braço longo dos cromossomos (Figura 3); já na população do córrego Cachoeira do Barbosa, o uso desta mesma sonda (18S) mostrou quatro marcações, todas na porção telomérica do braço curto (Figura 4). Tendo em vista que a situação mais comum entre os peixes é a ocorrência de NORs simples, com envolvimento de apenas um par de homólogos, a presença de marcações localizadas em posição intersticial em alguns cromossomos poderia se constituir em eventos secundários, ocorridos durante o processo de diversificação.

O gene ribossomal DNAr 5S é considerado altamente conservado (Danna *et al.*, 1996). Por ser um gene conservado e localizado em diferentes áreas do genoma, também tem sido utilizado como ferramenta para estudos filogenéticos e como um marcador populacional (Martins e Galetti Jr., 2001). É estruturado na forma de uma sequência menor dos genes ribossomais que não participa da formação do nucléolo. A unidade de repetição do DNAr 5S é uma sequência de 120pb associada a espaçadores não transcritos (Long e David, 1980) bastante variáveis, que possibilita um grande dinamismo a esse genes (Williams e Strobeck, 1985).

Analisando as populações amostradas de *Astyanax scabripinnis* pela aplicação da técnica da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de DNAr 5S, verificase o mesmo número de marcações (dois cromossomos) em todos os exemplares analisados, em todas as localidades (córregos Cascatinha, Funari, Capão Bonito e Cachoeira do Barbosa), com as marcações presentes na porção terminal do braço longo dos cromossomos (Figuras 1, 2, 3 e 4). Entre os Characiformes, a maioria das espécies estudadas apresenta um número máximo de quatro sítios de DNAr 5S, localizados preferencialmente em região intersticial dos cromossomos, próximo ao centrômero,

região esta que poderia ser considerada estratégica para a manutenção e preservação do gene, uma vez que estaria menos sujeita à permuta genética e à dinâmica dos rearranjos cromossômicos (Martins & Galetti Jr., 2001). Dados disponíveis para diferentes componentes da família Characidae, vêm mostrando ampla variabilidade envolvendo o número e a localização desses sítios nos cariótipos das espécies (Ferro *et al.*, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Kavalco *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2005).

As variações encontradas na microestrutura dos cariótipos dos exemplares nas diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* estudadas, em relação ao número de marcações, sua localização nos cromossomos e sua identificação com outros marcadores citológicos, como as regiões organizadoras de nucléolos caracterizadas pela marcação com Prata, reforçam a ação extensiva e a dinâmica dos agentes modificadores da estrutura cromossômica nesta espécie. Verifica-se expressiva diferenciação cromossômica entre as amostras analisadas, determinada provavelmente pelo hábito de vida dos animais em regiões restritas da cabeceira de rios e riachos, sendo que tais ambientes parecem favorecer a fixação das modificações ocorridas, uma vez que a combinação de genótipos seria dificultada pelas barreiras físicas interpostas. Tal contexto reforça a idéia de que tais organismos constituem bons modelos de estudo dos mecanismos envolvidos na diversificação cromossômica e, portanto, do processo de especiação deste grupo.

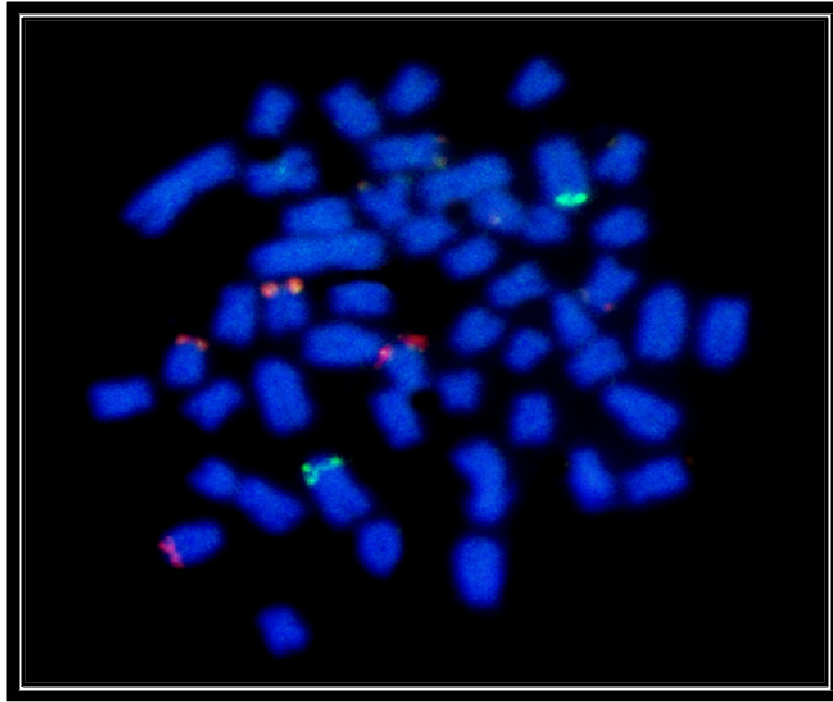


Fig.1 : Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cascatina, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação verde) e 18S (marcação vermelha).

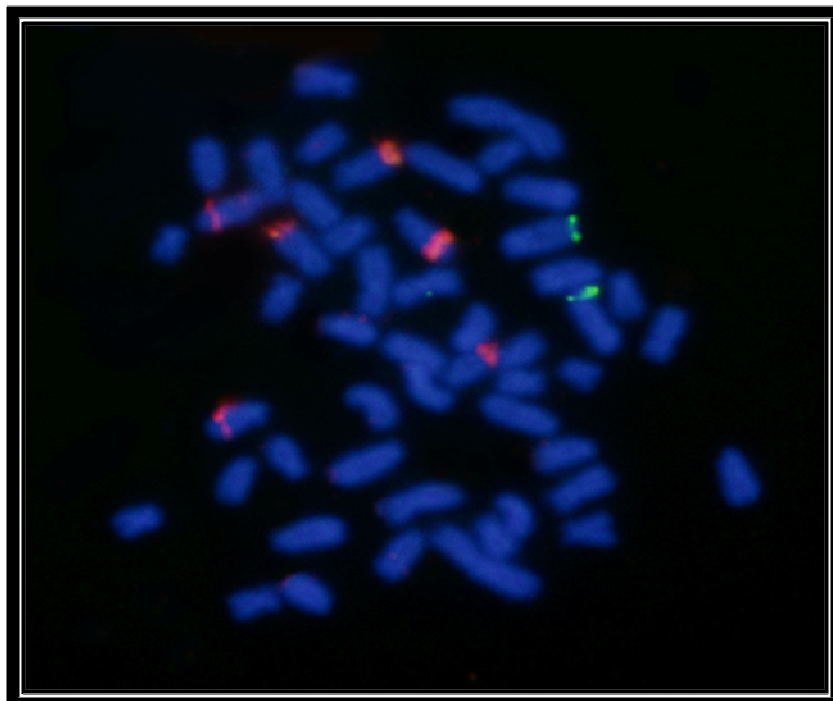


Fig. 2: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Estância Funari, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelha). Notar marcações intersticiais presentes em 4 cromossomos.

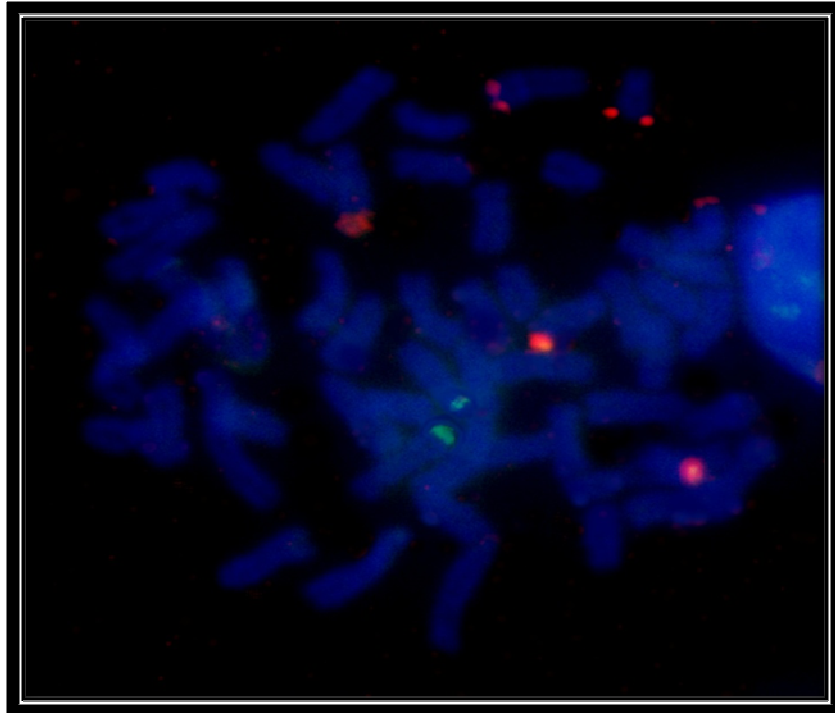


Fig. 3: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Capão Bonito, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (marcação verde) e 18S (marcação vermelho).

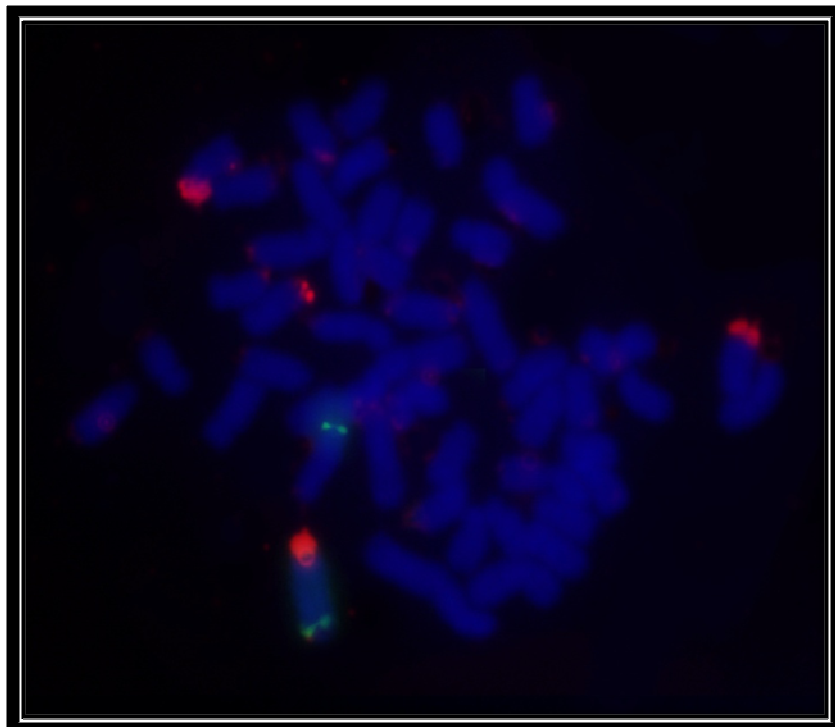


Fig. 4: Metáfase somática de *Astyanax scabripinnis* do córrego do Cachoeira do Barbosa, submetida à hibridação *in situ* fluorescente (Double FISH) com a sonda de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho). Notar marcação dupla num dos cromossomos.

CAPÍTULO III

Identificação de cromossomo supranumerário de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) por sonda cromossômica obtida por microdissecção

RESUMO

Estudos recentes, realizados com a aplicação de técnicas moleculares, têm buscado identificar aspectos da estrutura, possível função e origem dos cromossomos supranumerários. Estes elementos genômicos têm sido identificados em um número expressivo de espécies de peixes da região Neotropical e sua presença aparentemente neutra para os organismos portadores, constitui um aspecto ainda pouco resolvido nos estudos cariotípicos. Análises de sequências de DNA descritas para cromossomos B em peixes sugerem predominantemente uma origem intra-específica. Com o objetivo de analisar a presença destes elementos, os cromossomos B, na espécie *Astyanax scabripinnis*, foi utilizada uma sonda cromossômica total obtida a partir da microdissecção do cromossomo supranumerário do genoma de um indivíduo coletado no córrego do Cascatinha, componente da bacia hidrográfica do Rio Tietê, SP. Na aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em preparações cromossômicas desta mesma espécie com a sonda específica obtida, esta apresentou homologia somente com as regiões de heterocromatina que compõe as cromátides do cromossomo B, não sendo obtidas marcações nos cromossomos do conjunto A. Esta ausência de homogeneidade estrutural entre o cromossomo B e os cromossomos do complemento A parece fortalecer a hipótese da origem e evolução independente do cromossomo B em relação aos do complemento normal da espécie. Modificações ocorridas na sequência do DNA durante o seu processo evolutivo teriam determinado a diversificação deste cromossomo. Por outro lado, não pode ser excluída a possibilidade deste cromossomo ter tido sua origem a partir de doadores externos e este novo material genético teria, então, se fixado no genoma desta espécie, seguindo seu processo próprio de diferenciação.

INTRODUÇÃO

As análises cariotípicas realizadas na espécie de peixe *A. scabripinnis* tem revelado a ocorrência de uma extensiva diversificação da fórmula cariotípica, embora com pouca variação nos números diplóide. Entre os fatores determinantes da diversificação numérica dos cromossomos nesta espécie, um polimorfismo caracterizado pela presença de cromossomo supranumerário tem sido identificado, determinando em alguns indivíduos a presença de cromossomos B, caracterizados em diferentes tipos com base na sua morfologia nos padrões de heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000b.). Também foi verificado que a frequência dos cromossomos B nos indivíduos pode variar nas populações de acordo com diferentes fatores considerados, como a altitude da localidade de estudo (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Neo *et al.*, 2000). Porto-Foresti *et al.*, 1997 estudaram a frequência dos cromossomos supranumerários e a densidade populacional dessa espécie em três trechos consecutivos do córrego do Cascatinha (Botucatu, SP), tendo sido verificada maior frequência de cromossomos B nos indivíduos capturados nas regiões mais elevadas. Por outro lado, em estudos realizados em três populações de *A. scabripinnis* que ocorrem em diferentes altitudes em um mesmo riacho, Néó *et al.* (2000) identificaram a presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920m e 1800m), assim como sua ausência na população de 700m. Os autores concordaram que o modelo encontrado seria melhor interpretado sob a luz da teoria parasítica de evolução de cromossomos B, segundo o qual esses elementos seriam mais frequentes em condições ambientais mais favoráveis para a espécie. Neo *et al.* (2000) propuseram que o macrocromossomo B metacêntrico, bem como o microcromossomo encontrados em indivíduos das populações analisadas, teriam se

originado simultaneamente como isocromossomos, a partir de um cromossomo do grupo subtelocêntrico/acrocêntrico presente no complemento padrão desta espécie e que os demais tipos de cromossomos B encontrados representariam uma forma derivada deste grande metacêntrico B.

As análises moleculares realizadas neste tipo de cromossomos tem revelado que algumas sequências de DNA são específicas dos cromossomos B, enquanto outras são compartilhadas com aquelas encontradas nos cromossomos do complemento padrão A (Beukeboom 1994; Hackstein *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000, Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006). Os cromossomos supranumerários são, de modo freqüente, tipicamente heterocromáticos e compostos por seqüências de DNA repetitivo, as quais podem variar dinamicamente em termos de tipos de repetições e número de cópias (Amos & Dover, 1981; Matzke *et al.*, 1990; Sandery *et al.*, 1990; Eickbush *et al.*, 1992; Zeyl & Green 1992; Wilkes *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003). Contudo, a ocorrência de cromossomos B eucromáticos também já foi descrita em algumas espécies de peixes (Foresti *et al.*, 1989).

O simples fato de sequências de DNA serem compartilhadas entre os cromossomos A e B nos indivíduos portadores incita à hipótese da origem intra-específica destes cromossomos extras (Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000). Por outro lado, as sequências de DNA específicas de B podem ter surgido de uma rápida diferenciação e evolução independente, ocasionando a perda de homologia com as sequências dos cromossomos A dos quais foram derivados (hipótese intra-específica) (Jamilena *et al.*, 1994, 1995; Houben *et al.*, 1996; Peppers *et al.*, 1997; Cabrero *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000 entre outros) ou que os cromossomos B tenham sido derivados de cromossomos introduzidos por meio de acasalamentos interespecíficos (hipótese interespecífica) (Sapre & Deshpande, 1987; McVean, 1995; Scharl *et al.*,

1995; Perfectti & Werren, 2001, entre outros). Neste caso existem poucas descrições do surgimento de cromossomos acessórios por meio deste mecanismo (Perfectti & Werren, 2001). A maioria das hipóteses, entretanto, tem se estabelecido a partir da idéia de uma origem intra-específica, na qual os cromossomos B são derivados do componente do complemento cromossômico da própria espécie, pelo fato de compartilharem seqüências homólogas de DNA (Camacho *et al.*, 2000).

Com o uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), várias sondas cromossômicas vêm sendo produzidas com o intuito de proporcionar um melhor entendimento sobre questões evolutivas, filogenéticas e estruturais, entre outras, no estudo de peixes neotropicais. Dentre as sondas já obtidas têm destaque àquelas relativas a segmentos repetitivos do genoma, como a sonda As51 de *Astyanax scabripinnis* obtida por Mestriner *et al.* (2000), sondas SATH1 e SATH2 de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) obtida por Jesus *et al.* (2003) e a sonda 18S DNAr de *Prochilodus argenteus* obtida por Hatanaka & Galletti (2004).

O método de construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvido e aplicado a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992) tem sido amplamente utilizado em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, esta metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes e a obtenção de sondas específicas de cromossomos supranumerários neste grupo tornou-se uma prioridade na estruturação de mapas genômicos. Até o presente momento, sondas para este tipo de polimorfismo cromossômico já foram obtidas por meio da utilização de enzimas de restrição e de microdissecção (Voltolin, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de uma sonda total do macrocromossomo B encontrado em alguns indivíduos da espécie de peixe *Astyanax scabripinnis* por microdissecção. O marcador cromossômico assim obtido poderia ser utilizado em estudos sobre a origem e evolução destes elementos supranumerários na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados exemplares da espécie *Astyanax scabripinnis* coletados no córrego do Cascatinha, componente da bacia do rio Tietê na região de Botucatu/ SP, Brasil. Para o estudo das características cromossômicas, os indivíduos foram submetidos à estimulação mitótica (Oliveira *et al.*, 1988) e posteriormente foram obtidas suspensões direta de células renais, de acordo com método utilizado por Foresti *et al.* (1981).

A obtenção da sonda por microdissecção foi realizada de acordo com o protocolo seguido por Mühlmann *et al.*, (1995), utilizando um microscópio invertido (Nikon) e um micromanipulador manual (5171-Eppendorf) com uma agulha de vidro acoplada, previamente esterilizada. Foram microdissectados cerca de 6 cromossomos B de um exemplar de *A. scabripinnis* portador de apenas 1 elemento supranumerário, os quais foram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 0,5 ml da solução para DOP-PCR, que consiste de 14,5 µl água MiliQ, 2 µl de tampão da Thermostequeenase 10X, 4µl de dNTP (2,5 mM cada) e 2 µl de 2µM *primer* DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNNNAT GTG G 3') (Telenius *et al.*, 1992). A solução contida no tubo foi aquecida para desnaturação inicial a 90°C, por 10 min. Em seguida, adicionou-se 2,5 µl de 4U/µl termosequeenase (Thermo Sequenase CycleSequencing Kit

- USB). As reações de PCR foram realizadas em um Termociclador MasterCycler Gradient da Eppendorf nas seguintes condições: 94°C/3min, 12 ciclos a 94°C/1,5min.; 37°C/2min, 37°C/1s (subindo 0,2°C/s até 72°C); 72°C/2min seguido por 30 ciclos a 94°C/1,5 min.; 62°C/1min; 72°C/1,5 min. Após o DOP-PCR, realizou-se uma PCR convencional com uma reação de 33,5 µl de água miliQ, 5 µl de Tampão para PCR 10X, 4µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 3 µl de 100 µM DOP *primer*, 0,5 µl de 5U/µl de Taq polymerase e 2 µl do produto DOP-PCR. Por fim realizou-se uma outra PCR para efetuar a marcação desta sequência específica de DNA utilizando 32,5 µl de água miliQ, 5 µl de tampão para a Taq 10X, 4µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP (2,5 mM cada), 1µl de dUTP Tetramethyl-rhodamine (Roche Diagnostics), 3 µl de DOP *primer* (100 µM) e 0,5 µl de 5U/µl Taq polymerase. Adicionou-se 2µl do produto da 2ª PCR, totalizando um volume final de 50µl. Tanto a segunda como a terceira PCR foram realizadas nas seguintes condições: 90°C – 3min, 30 ciclos a 90°C – 1min e 30s; 56°C – 1min e 30s; 72°C – 1min e 30s.

A detecção do sinal da sonda específica do cromossomo B nos cromossomos da preparação metafásica foi realizada com a aplicação da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), segundo o protocolo utilizado por Porto-Foresti *et al.* (2002). As lâminas foram contracoradas com DAPI e fotografadas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX50, equipado com Epi-Fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas preparações cromossômicas de 73 exemplares (39 fêmeas e 34 machos) de *Astyanax scabripinnis*, provenientes do córrego do Cascatinha, região de Botucatu/SP. Todos apresentaram fórmula cariotípica padrão para a espécie (6m, 16sm,

14st, 14a), com o número diplóide de $2n=50$ cromossomos. Em 22 dos exemplares analisados foi identificada a presença de um cromossomo supranumerário do tipo metacêntrico grande, de tamanho similar ao do maior par do complemento A.

A ocorrência de cromossomos supranumerários ou cromossomos B é descrita de modo relativamente frequente em peixes, tendo sido caracterizada de modo eventual (Venere et al., 1999) em algumas espécies ou constituindo sistemas permanentes (Pauls & Bertollo, 1985, Oliveira et al., 2006), sendo considerados como elementos genômicos aparentemente desprovidos de função gênica específica (Foresti, 1998). Dentre as espécies que compõe o gênero *Astyanax*, os cromossomos B foram observados também em alguns exemplares de *A. eigenmaniorum* (Stripecke et al., 1985; Torres-Mariano, 2001), de *A. scabripinnis* (Salvador e Moreira –Filho, 1992; Porto-Foresti et al., 1997; Maistro et al., 1994; Vicente et al., 1996; Néó, 1999) e de *A. bockmanni* (Daniel, et al., 2009), entre outros.

Com o intuito de analisar a origem e a evolução dos cromossomos B nesta espécie, foi utilizada uma sonda obtida a partir do genoma de um indivíduo coletado no córrego do Cascatinha, neste caso uma sonda específica obtida por microdissecção do cromossomo supranumerário. Pela aplicação da técnica de hibridação *in situ*, a sonda apresentou homologia somente com a heterocromatina que compõe as cromátides do cromossomo B (Figura1). Este resultado indica uma ausência de homogeneidade estrutural entre o cromossomo B e os cromossomos do complemento A nos exemplares da população estudada. Assim, se tais elementos supranumerários tivessem sido originados a partir dos elementos do complemento A, estes teriam seguido uma evolução independente e intensiva, determinando modificações profundas na sequência de seu DNA para resultar em tal ausência de homologia. Por outro lado, não pode ser excluída a possibilidade de uma origem independente ou a partir de doadores externos

deste material genético diferenciado no genoma desta espécie, que seguiu depois seu processo próprio de diferenciação individual.

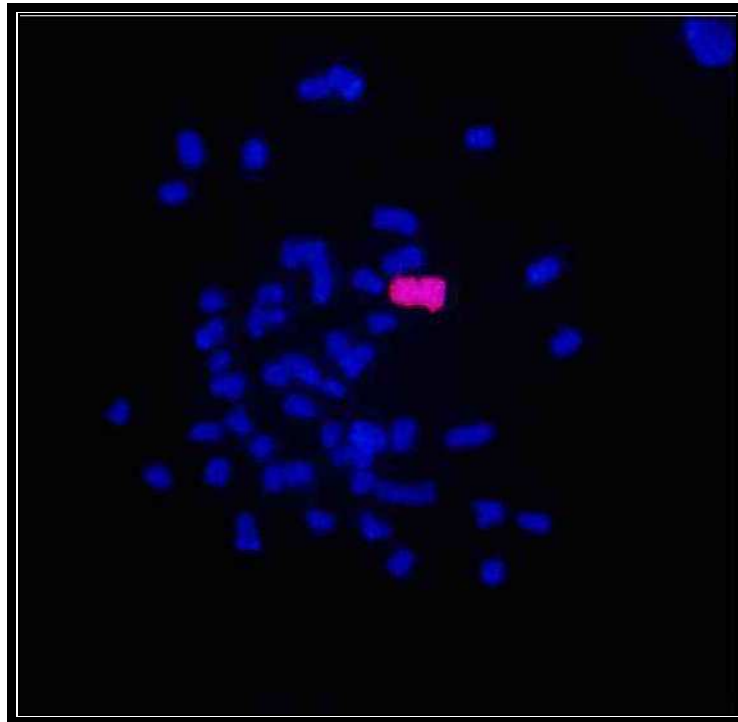


Fig. 1: Hibridação *in situ* fluorescente com a utilização da sonda construída a partir do cromossomo B (vermelho) em metáfases somáticas de exemplar de *A. scabripinnis* do córrego do Cascatinha. Observa-se a marcação fluorescente consistente apenas no cromossomo supranumerário.

O método de construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica total (WCP: Whole Chromosome Painting), desenvolvido e aplicado a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992) tem sido amplamente utilizado em vários grupos animais, assim como na citogenética humana. Entretanto, esta metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes e a obtenção de sondas específicas de cromossomos supranumerários neste grupo tornou-se uma prioridade na estruturação de mapas genômicos. Até o presente momento, poucas sondas para este tipo de polimorfismo cromossômico foram obtidas,

sendo principalmente por meio da utilização de enzimas de restrição, como a sonda As51 de *Astyanax scabripinnis* obtida por Mestriner *et al.* (2000), e as sondas SATH1 e SATH2 de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae), obtida por Jesus *et al.* (2003). Sondas específicas de cromossomos B obtidas por microdissecção apenas mais recentemente começaram a ser utilizadas (Voltolin, 2008)

Um aspecto intrigante dos cromossomos B é a obscura definição do seu significado genético em termos de origem, função, propriedades adaptativas e implicações evolutivas para os indivíduos portadores (Bougourd & Jones, 1997). Os estudos objetivando o entendimento da origem e evolução dos cromossomos supranumerários têm levado, em geral, à consideração de que estes elementos genômicos teriam uma origem intra-específica, por não-disjunção cromossômica (Volobujev, 1981) ou pela formação de isocromossomos (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006).

O padrão de hibridação *in situ* obtido com a utilização da sonda As51 por Mestriner *et al.* (2000) com a utilização da enzima de restrição *KpnI*, levou os autores a sugerirem que a origem dos cromossomos B em *A. scabripinnis* teria sido a partir da formação de isocromossomos, pois sequências repetitivas em ambos os braços do macrocromossomo B confirmaram os resultados apresentados por Vicente *et al.* (1996), que encontraram característica da heterocromatina do cromossomo B idênticas às de um par de cromossomos do conjunto A desta espécie.

A ausência de identidade entre os cromossomos supranumerários e os do complemento A em *Astyanax scabripinnis*, constatada pelos resultados de aplicação da técnica de hibridação *in situ*, com sonda resultante da microdissecção do cromossomo B de exemplar da própria espécie, leva à possibilidade do mecanismo de origem dos

cromossomos B ser decorrente de um processo de hibridação interespecífica, conforme descrito em vespas do gênero *Nansonia* por Perfectti & Werren (2001). O elemento novo introduzido seria uma região heterocromática heteróloga ao genoma de *A. scabripinnis* e a interação teria ocorrido em tempo recente. No entanto, não pode ser descartada também a idéia da origem destes elementos extras decorrer de um processo alternativo, conforme proposto por Foresti (1998), onde tais elementos poderiam surgir ao acaso “*de novo*”, como resultado do processo fisiológico normal das células e serem submetidos ao processo seletivo. Modificações morfológicas e estruturais poderiam ter ocorrido posteriormente.

Os dados obtidos neste trabalho levantam questões de interesse para os estudos nesta área, não só por se tratar da aplicação de uma técnica inovadora, que deverá contribuir de modo significativo para o entendimento da estrutura dos cromossomos supranumerários, bem como também possibilitar o levantamento de informações sobre os mecanismos envolvidos na origem e evolução destes elementos genômicos.

6 DISCUSSÃO GERAL

Considerando as características biológicas de *Astyanax scabripinnis*, associadas aos seus dados morfológicos, esta espécie se tornou bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna Neotropical. Os dados citogenéticos obtidos nos estudos sobre a espécie utilizada no presente trabalho, *Astyanax scabripinnis*, confirmam a extensa diversidade cromossômica desta espécie, que tem sido relatada em publicações de diferentes autores (Moreira-Filho, 1989; Souza *et al.*, 1995; Maistro *et al.*, 1999a; Mizoguchi & Martins-Santos, 1998; Centofante *et al.*, 2003; Neo *et al.*, 2000a) e, devido à grande diversidade cariotípica encontrada, esta espécie de peixes foi considerada componente de um complexo de espécies por Moreira-Filho & Bertollo (1991), denominado de “*complexo scabripinnis*”.

As razões para esta diversidade parecem decorrer principalmente às características biológicas deste grupo de peixes, pois *A.scabripinnis*, é uma espécie de água doce, que vive preferencialmente em ambientes de cabeceira de rios e riachos, podendo formar pequenas populações isoladas e com dinâmica evolutiva particular independente. Estas particularidades resultam na possibilidade de surgirem rearranjos cromossômicos distintos, que podem ser fixados em algumas populações (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Lowe-McConnell (1969) enfatizou que o tamanho absoluto de certos sistemas aquáticos é um importante fator no processo evolutivo dos peixes, desde que muitas espécies estejam envolvidas dentro do mesmo sistema, isolados de rios tributários e habitando lugares com barreiras interpopulacionais, físicas, químicas ou bióticas.

Desde de que as primeiras descrições das características cromossômicas de *Astyanax scabripinnis* começaram a ser realizadas em no início dos anos 90 por

Salvador & Moreira-Filho (1992), alguns indivíduos de algumas populações desta espécie têm mostrado também um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários. A partir destes trabalhos iniciais, macrocromossomos supranumerários foram encontrados também em exemplares de diferentes localidades e bacias hidrográficas, incluindo exemplares do córrego Cascatinha (Botucatu-SP), componente da bacia hidrográfica do rio Tietê e objeto de estudo do presente trabalho. Deve ser ressaltado, entretanto, que nos diversos estudos já realizados em *Astyanax scabripinnis*, diferentes tipos de cromossomo B foram identificados, com base na sua morfologia e padrão de heterocromatina constitutiva (Salvador & Moreira-Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1992; Maistro *et al.*, 1994a,b; Vicente *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997; Neo *et al.*, 2000a e b; Maistro *et al.*, 2001; Moreira-Filho *et al.*, 2001, 2004; Fernandes & Martins-Santos, 2005).

A utilização de marcadores citogenéticos rotineiros em trabalho de citogenética como Giemsa, RONS e Banda C e também de marcadores citogenético-molecular (FISH), com a utilização de sondas de genes ribossomais 5S e 18S revelaram uma estrutura cariotípica preenchida de particularidades específicas para cada população. Foram encontradas diferenças quanto à localização e distribuição da heterocromatina constitutiva em três populações (córregos Cascatinha, Cintra e Funari), que se apresentaram na região telomérica de alguns pares cromossômicos, enquanto que nas demais localidades (córrego Capão Bonito e Cachoeira do Barbosa) se apresentaram apenas na região centromérica. Estes dados conferem com observações gerais nos peixes, que apresentam uma tendência para a presença de blocos heterocromáticos em posição centromérica e telomérica (Almeida-Toledo *et al.*, 1981; Gold *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Foresti *et al.*, 1989).

O macrocromossomo B encontrado nos exemplares de *A. scabripinnis* coletados no córrego Cascatinha é do tipo metacêntrico grande, equivalendo em tamanho ao do primeiro par cromossômico do cariótipo, apresentando-se em geral homoganeamente corado (inteiramente heterocromático), confirmando resultados encontrados para exemplares desta localidade e descritos anteriormente por vários autores (Maistro *et al.*, 1994, Porto-Foresti *et al.*, 1997, Maistro *et al.*, 1998, Maistro *et al.*, 2001).

Com a impregnação das preparações cromossômicas por nitrato de Prata (Ag-¹⁰⁵RON), foi possível observar RONS múltiplas localizadas na porção telomérica do braço curto dos cromossomos, em exemplares provenientes do córrego do Cascatinha; RONS simples, marcando apenas um par de cromossomos, com marcas também na região telomérica do braço curto em exemplares provenientes do córrego Cintra; RONS múltiplas com marcações na região intersticial de dois pares cromossômicos em exemplares provenientes do córrego da Estância Funari; RONS simples, marcando apenas um par cromossômico em sua região terminal do braço curto, nos exemplares provenientes do córrego Capão Bonito e do córrego Cachoeira do Barbosa. Utilizando a coloração com o fluorocromo CMA₃ também foram identificados segmentos marcados nos mesmos cromossomos envolvidos com as RONS, nos exemplares de todas as localidades estudadas. Algumas subfamílias de Characidae podem ser caracterizadas por apresentarem RONS simples, presentes em um par cromossômico como *Bryconinae* (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Margarido e Galetti Jr., 1996) ou múltiplas, quando presentes em mais de um par de cromossomos, como *Serrasalminae* (Galetti Jr., Silva e Cerminaro, 1985b). No gênero *Astyanax*, além do tipo simples, também foram descritas várias ocorrências de sistemas de RONS múltiplas (Pfister e Moreira-Filho, 1997; Pastori *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 1998; Robaina *et al.*, 1998), sendo que para esta

espécie, Rocon stange e Almeida- Toledo (1993) observaram de um a 15 cromossomos marcados pelo nitrato de Prata.

Com a finalidade de se obter dados consistentes sobre a localização e a quantidade exata de cístrons ribossômicos nesta espécie, foi aplicada a técnica e hibridação *in situ* (FISH) com a utilização da sonda de DNAr 18S. Esta técnica vem se mostrando uma ferramenta bastante precisa na detecção e mapeamento das RONS ao longo do complemento cromossômico, pois podem identificá-las independentemente da sua atividade funcional durante a interfase anterior à divisão celular (Peres, 2005). Esta técnica, aplicada nas preparações cromossômicas dos exemplares provenientes da população de *Astyanax scabripinnis* do córrego Cascatinha, permitiram evidenciar quatro marcações de sítios de DNAr 18S e em relação ao número de sítios de Ag-RONs três marcações e CMA₃ seis marcações; no córrego da Estância Funari a hibridação *in situ* (18S) marcou seis cromossomos e em relação ao número de sítios de Ag-RONs três marcações e CMA₃ nove marcações; nos exemplares pertencentes ao córrego Capão Bonito foram visualizadas seis marcações de sítios de DNAr 18S e em relação ao número de sítios de Ag-RONs duas marcações (um par) e CMA₃ dez marcações; e ainda nos indivíduos do córrego Cachoeira do Barbosa a hibridação *in situ* (18S) marcou quatro cromossomos e em relação ao número de sítios de Ag-RONs duas marcações (um par) e CMA₃ cinco marcações.

É relativamente comum a ocorrência de um número maior de sítios identificados pela hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S do que aqueles identificados pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, como descrito ocorrer em *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000), *Astyanax scabripinnis* (Ferro *et al.*, 2001; Kavalco e Moreira-Filho, 2003) e em *Prochilodus lineatus* (Jesus e Moreira-Filho, 2003).

Entre os peixes (Pendás et al., 1993; Vicari et al., 2005) e anfíbios (Schmid, 1982), as RONS apresentam-se geralmente como sítios positivos para os fluorocromos GC específicos, como a Cromomicina e a Mitramicina. No entanto, alguns segmentos de heterocromatina, que não são relacionados a sítios de RONS, também podem apresentar fluorescência e sinais brilhantes após a coloração com estes fluorocromos GC específicos (Artoni et al., 1999).

O gene ribossomal DNAr 5S é considerado altamente conservado (Danna *et al.*, 1996). Por ser um gene conservado e localizado em diferentes áreas do genoma, está sendo utilizado como referência em estudos filogenéticos e também como um marcador populacional (Martins e Galetti Jr., 2001). Constitui uma sequência menor dos genes ribossomais que, no entanto, não participa da formação do nucléolo. A unidade de repetição do DNAr 5S é uma sequência de 120pb, associada a espaçadores não transcritos (Long e David, 1980) bastante variáveis que possibilita um grande dinamismo a esse genes (Williams e Strobeck, 1985).

Analisando as populações de *Astyanax scabripinnis* com o uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e utilizando a sonda de DNAr 5S, verifica-se o mesmo número de marcações (dois cromossomos) para todos os exemplares componentes das amostragens realizadas em todas as localidades que tiveram este gene estudado (córrego Cascatinha, Funari, Capão Bonito e Cachoeira do Barbosa). Entre os Characiformes a maioria das espécies estudadas apresenta um número máximo de quatro sítios de DNAr 5S, localizados preferencialmente em região intersticial próxima ao centrômero, região esta que poderia ser considerada estratégica para a manutenção e preservação do gene, uma vez que estaria menos sujeita à ação de rearranjos cromossômicos (Martins & Galetti Jr., 2001).

A partir de preparações cromossômicas de indivíduos coletados no córrego Cascatinha, foi possível obter uma sonda total do macrocromossomo B metacêntrico de *Astyanax scabripinnis* pela aplicação da técnica de microdissecação. Verificou-se que esta sonda hibridou apenas no próprio cromossomo supranumerário e não foram observadas marcações em nenhum dos cromossomos do complemento A. O comportamento de associação da sonda, tanto para o cromossomo B como para os cromossomos do complemento A, parecem apontar para um processo de origem independente do cromossomo B destas populações, em relação aos demais cromossomos componentes do cariótipo.

É importante salientar também que a aplicação da técnica de microdissecação cromossômica em estudos de cromossomos de peixes é uma novidade nos laboratórios do país, embora já venha sendo bastante utilizada desde há algum tempo em vários trabalhos citogenéticos, principalmente na construção e caracterização de sondas específicas para cromossomo B e cromossomos sexuais de vários organismos.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no estudo das características cromossômicas de diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* tendo por base seus aspectos estruturais e moleculares, a partir exemplares capturados em amostragens realizadas em córregos e riachos pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema, na região de Botucatu, SP, permitem concluir que:

1) Os representantes da espécie de peixe *Astyanax scabripinnis* analisados no presente trabalho apresentaram número diplóide conservado de $2n=50$ cromossomos, coincidente com o que se apresenta mais comumente para esta espécie. No entanto, em alguns indivíduos capturados na localidade córrego do Cascatinha, apresentaram um macrocromossomo supranumerário, sendo que em um dos indivíduo analisados foi constatada a presença de dois cromossomos supranumerários. Nas amostras analisadas, as fórmulas cariotípicas apresentaram variação com relação aos diferentes tipos cromossômicos.

2) A análise dos padrões de heterocromatina constitutiva pela técnica de bandamento C revelou um padrão semelhante em todas as localidades (marcações teloméricas), com exceção para os exemplares provenientes do córrego Capão Bonito, que apresentaram blocos expressivos de heterocromatina nas regiões centroméricas e do córrego Cachoeira do Barbosa que, além de marcações centroméricas apresentaram também marcações teloméricas.

- 3) A impregnação por nitrato de Prata identificou RONS múltiplas e simples nas populações estudadas, estando a maioria das marcações localizadas na porção telomérica do braço curto dos cromossomos portadores, com exceção dos exemplares da população do córrego da Estância Funari que apresentaram marcações intersticiais.

- 4) As regiões cromossômicas ricas em GC identificadas pela técnica de coloração com o fluorocromo Cromomicina (CMA₃), evidenciou blocos fluorescentes geralmente coincidentes com as marcações obtidas pela técnica Ag-RONS, identificando marcadores nucleolares simples e múltiplos.

- 5) Os cístrons ribossômicos foram também identificados pela aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando a sonda de DNAr 18S, que revelou de quatro a seis marcações, geralmente coincidentes com a marcação das RONS obtidas por outros métodos e com a sonda de DNAr 5S, que revelou duas marcações apenas em todos os indivíduos de todas as amostras estudadas. Enquanto o gene DNAr 18S mostrou certa variabilidade de marcação, com regiões possivelmente inativas e não detectadas pela técnica Ag-RONS, o gene DNAr 5S mostrou-se conservado.

- 6) As expressivas variações cariotípicas experimentadas pelos representantes das diferentes populações de *Astyanax scabripinnis* analisados no presente trabalho confirmam a atuação dos processos de modificação cromossômica que atuam nas populações isoladas, características deste grupo de peixes. Sem modificações aparentes na macroestrutura cromossômica, os indivíduos de cada grupamento podem fixar alterações que são expressas em suas fórmulas cariotípicas particulares, indicativas da ação do processo de diferenciação.

7) A microdissecação do macrocromossomo B, identificado em uma das populações desta espécie, possibilitou a confecção de sonda total para este segmento genômico. Esta sonda foi posteriormente submetida à hibridação *in situ* em preparações cromossômicas de exemplares desta amostra e revelou afinidade apenas com o próprio cromossomo B, sem evidenciar marcações nos cromossomos do complemento normal. Tal condição reforça a hipótese de origem independente deste tipo de cromossomo nesta amostra.

8 REFERÊNCIAS

- Abel, L. D. S.; Moreira-Filho, O. (1998) Citogenética de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio São Francisco. In: Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, 7., Londrina.
- Abilhoa, V. & Duboc, L. F. (2004) PEIXES- Água doce, p.581-677. In: S.B. Mikich & R.S. Bémils (Eds). Livro Vermelho dos animais ameaçados de extinção no estado do Paraná. Curitiba, Mater Natura e Instituto Ambiental do Paraná. XVI+ 764p (<http://www.pr.gov.br/iap>).
- Affonso, P.R.A.M. (2000). Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo, S.A. (1981). Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apteronotus albifrons* (Pisces, Apteronotidae). *Experientia*, 37: 953-954.
- Almeida-Toledo, L.F. & Foresti, F.A.L. (1985) As regiões organizadoras de nucléolo em peixes. *Ciência e Cultura*, v.37, p.448-453.
- Almeida-Toledo, L.F.; Bigoni, A.P.; Bernardino, G.; Foresti, F. & Toledo-Filho, S.A. (1996). Karyotype and NOR with heterochromatin reorganization in neotropical *Bryconids*. *Caryologia*, v. 49, p. 35-43.
- Alves, A.L. & Martins-Santos, I.C. (1997). Cariótipos de duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Ivai. *43º Congresso Nacional de Genética*. Resumos, p.97.

- Amos, A.; Dover, G. (1981). The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosome in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma*, v. 81, p. 673-690.
- Andreato, A.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Oliveira, C.; Toledo-Filho, S.A. (1992). Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tirtenses*. *Cytologia*, 57: 369-372.
- Artoni, R.F.; Molina, W.F.; Bertollo, L.A.C. & Galetti Jr. P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). *Geneics and Molecular Biology*, 22: 39-44, 1999.
- Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Endle, A.L.; Cavallaro, Z.I.; Jesus, C.M.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2006). Banding pattern of A and B chromosome of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosome evolution. *Genetica*, v. 127, p. 277-284.
- Barros, N. M. T.; Ganasso, E.; Cenci, M. A.; Pazza, R.; Margarido, V. P. (1998). Descrição do cariótipo de *Astyanax sp* (Characidae, Tetragonopterinae) coletado no rio Vorá-Bacia do Iguaçu. In: Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada de peixes neotropicais, 7., Londrina.
- Bayley, P.B. & Li, H.W. (1992). Riverini fishes. In: Calon, P.; Petts, G.E. (Eds.) The rivers handbooks: hydrological and ecological principles. *Oxford Blackwell Sci.* v.2, p251-281.
- Bertollo, L.A.C.; Moreira Filho, O.; Galetti, P.M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of fresh-water fish. *J.Fish Biol.*, 28: 153-159. *Genetica and Cell Genetic*. V. 60, p. 60-63.

- Bertollo, L.A.C.; Cavallaro, Z.I. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW chromosome system in Characid fish, *Tripottheus*
- Beukeboom, L.M. (1994). Bewildering Bs: an impression of the I B-chromosome conference. *Heredity* 73:328-336.
- Born, G.G.; Bertollo, L.A.C. (2000), Na XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, v. 8, p. 111-118.
- Bougourd, S.M.; JoNES, r.n. (1997) B-chromosome: a physiological enigma. *New Phytol.* v.137, p. 43-54.
- Britski, H.A. (1972).Peixes de água doce do estado de São Paulo. Sistemática In: Poluição e Piscicultura 79-108. Faculdade de Saúde Pública da Universidade do Estado de São Paulo- Instituto de pesca da C.P.R.N. da Secretária de Agricultura.
- Britski, H. A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S. (1984). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: Câmara dos deputados, Coordenação de publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca.
- Britski, H.A., Sato, Y. & Rosa, A.B.S. (1986). Manual de identificação dos peixes da região de Três Marias. CODEVASP Brasília, 115p.
- Buckup, P.A., Menezes, N.A. & Ghazzi, M.S. (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Cabrero, J.; López-Léon, M.D.; Bakkali, M.; Camacho, J.P.M. (1999). Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, v. 83, p. 435-439.

- Camacho, J.P.M. (1993). Polimorfisms and geographic distribution. First B-chromosome Conference - Anais. Universidad Autonoma de Madri, Espanha.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v.355, p.163-178.
- Caramaschi, E.M.P. (1986). Distribuição de ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Doctoral Thesis. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
- Castro, M.C.R. & Casatti, L. (1997). The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River Basin, Southeastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 7(4): 337-352.
- Cavallaro, Z.I.; Bertollo, L.A.C.; Perfeetti, F.; Camacho, J.P.M. (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research* 8:627-634.
- Cestari, M.M. & Galetii Jr., P.M. (1992). Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Charadae, Serrasalminae) from the Parana-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. *Copeia* 1: 108-112.
- Cestari, M.M. (1996). Estudos citogenéticos preliminares de peixes pertencentes a bacia do Rio Iguacu. In: Anais do III Encontro Paranaense de Genética. Curitiba, Brasil.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Justi, A.J.; Moreira-Filho, O. (2003). Correlation of chromosomal and morphologic characters in two *Astyanax* species (Teleostei, Characidae). *Ichthyol Explor Freshwaters*, 14: 361-368.
- Cole, C. J.; Leavens, C.R. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetology*, v.3, p.102.

- Cuadrado, A.; Jouve, N. (1994). Highly repetitive sequences on B-chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, v.37, p. 709-712.
- Daniel, S.N. ; Hashimoto, D.T. ; Bortolozzi, J.; Fforesti, F.; Porto-Foresti, F. Cromossomos B em *Astyanax bockmanni*: análise da frequência em uma população da bacia do Rio Paranapanema, região de Bauru, SP. In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia/SP. 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009.
- Daniel-Silva, M.F.Z. (1996). Estudos citogenéticos comparativos em quatro espécie do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Master's thesis, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Danna, K.J.; Workman, R.; Coryell, V. & Keim, P. (1996). 5S DNAr genes in tribe Phaseoleae: array size, number, and dynamics. *Genome*, 39: 445-455.
- Dantas, E.S.O.(2002). Estudos citogenético comparativos em três espécies de *Moenkhausia* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae) de localidades diferentes. Dissertação de Mestrado. Univers. Federal de São Carlos, SP.
- Dergan, J. & Bertollo, L.A.C. (1990). Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná Basins, Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, 13: 755-756.
- Eickbush, D.G.; Eickbush, T.H.; Werren, J.H. (1992). Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma*, v. 101, p. 575-583.
- Erdtmann, B.; Calcagnoto, D.; Rabolini, L.; Malabarba, L.R. (1990). Variabilidade cromossômica em *Callichthys callichthys* (Callichthyidae, pisces). Abstr. *Ciência e Cultura*, 452p.

- Falcão, J.N. (1988). Caracterização cariotípica em peixes do gênero *Triportheus* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tese de doutorado. Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Fauaz, G.; Vicente, V.E. & Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B chromosome in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 17: 157-163.
- Fernandes, C.A. & Martins-Santos, I.C. (2005). Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica*, 124: 301-306.
- Ferro, D.A.M, Neo, D.M., Moreira-Filho, O. & Bertllo, L.A.C. (2001). Nuclear organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genética*, V.110, p.55-62.
- Fink, S.V. & Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 72(4): 297-353.
- Fontana, F.; Tagliavini, J.; and Congiu, L. (2001). Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica* 111: 359-373.
- Foresti, F., Toledo, L. F. A., Toledo-Filho, S. A. Polimorphic nature of nucleolus organizer region in fishes. *Cytogenet Cell Genetics*, v.3 1, p. 137-144, (1981).
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F.; Toledo, S.A. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79: 107-114.

- Foresti, F. (1998). Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Resumos A1, Londrina-PR.
- Fowler, H.W. (1948). Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia, Departamento da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, Brasil*, 6: 1-204.
- Franks, T.K.; Houben, A.; Leach, C.R.; Timmis, J.N. (1996). The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, v.105, p. 223-230.
- Froese, R & Pauly, D. (2005). Fish Base World Wide Web Electronic Publication, WWW.fishbase.org, version (11/2005).
- Galetti, P.M.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (1981). Heteromorphic sex chromosome in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 29: 138-142.
- Galetti, P.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (1985a). A ocorrência de NORs simples e múltiplas caracterizando diferentes grupos de peixes. In: XII Congr. Brasil. Zool. p.175.
- Galetti, Jr.P.M.; Solva, E.B.; Germinaro, R.T. (1985b). A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 8, p. 479-484.
- Galetti, P.M. & Foresti, F. (1986). Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 43: 43-46.

- Galetti Jr, P.M.; Mestriner, C.A.; Venere, P.C. & Foresti, F. (1991). Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 56: 116-121.
- Galetti Jr., P.M. (1998). Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.* 65 Suppl.:53-56.
- Galetti Jr., P.M.; Bertllo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (1994). Trends in chromosome evolution of neotropical characiformes fishes. *Caryologia* (1994) 47: 289-297.
- Garcia, E.; Alvarez, M.C.F.; Thode, G. (1987). Chromosome relationships in the genus *Blennius* (Blenniidae, Perciformes). C banding patterns suggest two karyoevolutional pathways. *Genetica*, 72: 27-36.
- Gery, J. (1977). Characoids of the world. Neptune City, New Jersey. T.F.H. Publications, 672 p.
- Giuliano-Caetano, L. & Bertollo, L.A.C. (1988). Karyotypic variability in *Haplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characiformes, Erythrinidae). Chromosome polymorphism in the Rio Negro population (Manaus, State of Amazonas). *Revista Brasileira de Genética*, 11: 299-306.
- Gold, J.R.; Amemyia, C.T.; Ellison, J.R. (1986). Chromosomal heterochromatin differentiation in north American. Cyprinid fishes. *Copeia*, 1: 557-566.
- Guerra, M. (1988). Introdução a Citogenética Geral. Editora Guanabara, Rio de Rio de Janeiro.
- Hackstein, J.H.P.; Hochstenbach, R.; Hauschteck-Jungen, E.; Beukeboom, L.W. (1996). Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *Bio Essays*, v.18, p.317-323.

- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 122. P. 239-244.
- Houben, A.; Kynast, R.G.; Heim, U.; Hermann, H.; Jones, R.N.; Forster, J.W. (1996). Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, v. 105, p. 97-103.
- Jamilena, M.; Ruíz-Rejón, C.; Ruíz-Rejón, M. (1994). A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Science*, v. 107, p. 703-708.
- Jamilena, M.; Garrido-Ramos, M.; Ruíz-Rejón, M.; Ruíz-Rejón, C.; Parker, J.S. (1995). Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, v. 104, p. 113-120.
- Jesus, C.M. (2000). Caracterização de seqüências repetitivas no genoma de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), portadores de cromossomos B. Tese. Universidade Federal de São Carlos. 109p.
- Jesus, C.M.; Galetti, Jr P.M.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a specie with B chromosome. *Genetica* 118: 25-32.
- Jin, S.M. & Toledo, V. (1975). Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Cienc. Cult.*, 27: 1122-1124.
- Jones, R.N., & REES, H., (1982). B chromosomes. New York. Academic Press, 266p.
- Kao, T.T. (1990) Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Research*, v.360, p. 89-104.

- Kavalco, K.F.; Moreira-Filho, O. (2003). 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.
- Lee, M.R.; Elder, F.F.B. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet Cell. Genet*, v.26, p. 36-40.
- Levan, A., K. Fredga & A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P. A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassati, S.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F. (2003). Genera *Incertae sedis* in Characidae, In: Reis, R.E.; Kullander, S.V.E.N.O.; Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs.
- Long, E.O.; David, I.D. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 727-764.
- López-Léon, M.D., Neves, N., Schwarzacher, J.S., Heslop- Harrison, J.S. (Pat.), Hewitt, G.M. & Camacho, J.P.M., (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double fish technique. *Chromosome Research* v.2, p. 87-92.
- Lucena, C.A.S.D. (1993). Estudos filogenéticos da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Lundberg, J.G. et al. (2000) So many fishes, so little time: na overview of recent ichthyological discovery in continental water. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.87, p.26-62.

- Maistro, E.L., Foresti, F., Oliveira, C. & Bertollo, L.A.C. (1992). Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of sex chromosomes. *Caryologia* 47: 233-239.
- Maistro, E.L.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1994). New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Revista Brasileira de Genética*, 17: 153-156.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998). Comparative Cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and molecular Biology* 21(2):201-206.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C. & Foresti, F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.*, 23(2): 365-369.
- Maistro, E.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2001). Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 110: 177-183.
- Mantovani, M. *et al.* (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 536-542.
- Margarido, V.P. & Galetti, P. M. Jr. (1996). Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228.
- Margarido, V.P. & Galetti Jr. P.M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22: 357-361.

- Martins-Santos, I.C.; Julio, H.F.; Santos, S.J. (1994). Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana river. *Cytologia*, 59: 175-181.
- Martins, C.; Galetti P.M. (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363-367.
- Martins, C.; Galetti Jr, P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, v. 44, p. 903-910.
- Matzke, M.; Varga, F.; Berger, H.; Scherthaner, J.; Schweizer, D.; Mayr, B.; Matzke, A.J.M. (1990). A 41-42 tandemly repeated sequence isolated from nuclear envelopes of chicken erythrocytes is located predominantly on microchromosomes. *Chromosoma*, v.99, p.131-137.
- Mcvean, G.T. (1995). Fractious chromosomes hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *Bio Essays*, v. 17, p. 579-582.
- Melo, C.E. (2000). Ecologia comparada de ictiofauna em córregos de cerrado do Brasil central: bases para a conservação das espécies. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em ecologia e recursos naturais, Universidade Federal de São Carlos (SP). 83pp.
- Mestriner, C. A., Bertollo, L.A.C. & Galetti Jr. P. M., (1995). Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustres* (Pisces, Anostomidae): analysis of a Sex sytem. *Chromosome Research*. V.3,p.440-443.
- Mestriner, C.A.; Galetti Jr,P.M.; Valentinis, S.R. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in cherecid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9.

- Mizoguchi, S.M.H.N. & Martins-Santos, I.C. (1997) Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis*. (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127: 249-253.
- Mizoguchi, S.M.H.N. & Martins-Santos, I.C. (1998). Cytogenetics and morphometric differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil . *Genet. Mol. Biol.* 21: 55-61.
- Molina, W.F. (1995). Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Dissertação de mestrado. Departamento de Genética e Evolução, UFSCAR.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Geletti, Jr.P.M. (1985). Karyotypic studies of some specimes of family *Parodontidae* (Pisces, Cypriniformes). *Caryologia* 38: 47-55.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1986). Estuda cariotipo comparative nos grupos “*fasciatus*” e “*scabripinnis*” (Teleostei, Characiformes, Characidae). *I Simpósio de Citogenética e Apicada de peixes neotropicais, Universidade Federal de São Carlos-SP Resumos, p.50.*
- Moreira-Filho, O. (1989). Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Jenins, 1842) (Pisces, Characidae). Tese de doutorado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos. 135pp.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr., P.M. & Bertollo, L.A.C. (1978). Variabilidade cromossômica na subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Chacaridae). *Ciência e Cultura*, 30-suplemento: 548-549.
- Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Chacaridae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 331-358.

- Moreira-Filho, O.; Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Bertollo, L.A.C. (2001). Occurrence a metacentric macrochromosome B in different species the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 66: 59-64.
- Moreira-Filho, O.; Galetti Jr, P.M.; Bertollo, L.A.C. (2004). B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): Na overview in natural populations. *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 230-234.
- Morelli, S. (1981). Aspectos citogenéticos do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.
- Morelli, S., Bertollo, L.A.C., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Toledo Filho, S.A. (1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia* 36: 235-244.
- Morelli, S., Bertollo, L.A.C. & Moreira-Filho, O. (1983b.) Cytogenetics considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). II Occurrence of natural triploidy. *Caryologia* 36: 245-250.
- Muhlmann-Diaz, M.C.; Christian, A.T.; Bedford, J.S. (1995). Chromosome microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Wirzburg, Germany.
- Nelson, J.S. (1994). Fishes of the World. 3 Edition, John Wiley & Sons, Inc. New York USA.
- Nelson, J. S. (2006) Fishes of the world. Hoboken, John, Wiley and Sons, 4th ed., 624p.
- Néo, D. M. (1999). Distribuição dos cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) ao longo do Ribeirão Grande, na região de Campos de Jordão-SP. São Carlos. Dissertação (mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, 1999. 85p.

- Néo, D.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000a). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85: 136-141.
- Néo, D.M. , Bertollo, L.A.C. Moreira-Filho, O., (2000b). Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v. 108, p. 211-215.
- Ocalewicz, K.; Jankun, M. & Luczynski, M. (2006). Cytogenetic characteristics of interspecific hybrids and chromosome set manipulated finfish. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F. & Kapoor, B.G. (eds.), *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- Ogutu-Ohwayo, R. (1990). The decline of the native fishes of lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticos*, *Oreochromis niloticus*. *Environ. Biol. Fish.* V. 27, p. 81-96.
- Ojima, Y. (1983). Fish cytogenetics. In: *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*, CRC Press, A.K. Sharma & A. Sharma eds., 1: 111-145.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H. & Toledo-Filho, S.A. (1988). Chromosome formules of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética*, 11(3) 577-624.
- Oliveira, C. & Foresti, F. (1994). Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: V Simp. Citogenet. Evolut. Aplic. Peixes neotrop., p. 6.
- Oliveira, C., Saboya, S.M.R., Foresti, F., Senhorini, J.A. & Bernadino, G., (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, v.79, p.473-476.

- Oliveira, C. (2000). Síntese dos estudos citogenéticos em peixes Neotropicais. Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de peixes, Manaus, AM, 108p.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. & Foresti, F. (2006). Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F. & Kapoor, B.G. (eds.), Fish Cytogenetics, Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- Ozouf- Costaz, C. & Foresti, F. (1997). Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology. *Netherlands Journal of Zoology*, 42 (2-3): 277-290.
- Paganelli, H.H. & Moreira-Filho, O. (1986). Considerações cariotípicas de *Astyanax fasciatus* (Characiformes, characidae) de três bacias hidrográficas. XIII Congresso Brasileiro de Zoologia. Resumos p.20.
- Pastori, M.; Fenocchio, A.; Rocanti, H.; Moreira-Filho, O. (1998). Estudos citogenéticos em *Astyanax schubarti* (Characiformes). Simpósio de citogenética evolutiva e aplicada de peixes neotropicais, 7., Londrina.
- Pauls, E. & Bertollo, L.A.C., (1985). Evidence for a system supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, 36 (4): 307-314.
- Pauls, E. (1983). Considerações sobre a evolução cromossômica e sistema de cromossomos supranumerários em espécie do gênero *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Peppers, J.A.; Wiggins, L.E.; Baker, R. J. (1997). Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, v.5, p. 475-479.
- Perfectti, F.; Werren, J.H. (2001) The Interspecific Origin of B Chromosomes: Experimental Evidence. *Evolution*, v.55, p.1069-1073.

- Peres, W.A.M. (2005). Análise da diversidade cariotípica de Characidae na bacia do São Francisco, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Sp, Brasil.
- Pfister, S. C.; Moreira-Filho, O. (1997). Caracterização citogenética de uma população de *Astyanax eigenmanniorum*. *Brazilian Journal of Genetics*, São Paulo, v.20, n.3, p.101.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, v. 83, p.2934-2938.
- Portela, A.L.B.S., Galetti, P.M Jr. & Bertollo, L.A.C. (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Revista Brasileira de Genética*. 11(2):307-316.
- Portela, A.L.B.S., Júlio Jr., H.F., & Nishiyama, P.B., (2001). New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaflomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genética*, v. 110, p.277-283.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Maistro, E.L. & Foresti, F. (1997). Estimated frequency os B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brazil. J. Genet.*, 20(3): 377-380.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Tabata, Y.A.; Rigolino, M.G.; Foresti, F. (2002). NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hereditas*, v. 136, p. 227-230.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Tabata, Y.A.; Rigolino, M.G. & Foresti, F. (2006). NOR markers in the identification and management of cultured fish species: The case of Rainbow Trout stocks reared in Brazil. In: Pisano, E.; Ozouf- Costaz, C.; Foresti, F.

- & Kapoor, B.G. (eds.), *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- Post, A. (1965). Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Susswasser Teleosteen. *Z.Zool. Syst. Evol. Forsch.* 3: 47-93.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferrari, C.J.Jr (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Robaina, T. F.; Lemos, P. M.; Cestari, M. M. (1998). Estudos citogenéticos em *Astyanax* sp B (Characidae) do riacho Cachoeira-Petrocix, São Matheus do Sul (PR). In: Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, 7., Londrina.
- Rocon-Stange, E.A. & Almeida-Toledo, L.F. (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Brazilian Journal of Genetics* 16: 601-615.
- Salvador, L.B. & Moreira-Filho, O. (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69: 50-56.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sandery, M.J.; Forster, J.W.; Blunden, R.; Jones, R.N. (1990). Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome*, v.33, p. 908-913.
- Santos, M. (2000). Diversidade genética em populações de *Astyanax scabripinnis* (Jenys, 1842) coletados em riachos de diferentes altitudes da Região de Campos de Jordão, SP. Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
- Sapre, A.B.; Deshpande, D.S. (1987). Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity*, v.78, p. 191-196.

- Schaeffer, S.A. (1998). Conflict and Resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. & Lucena, C.A.S. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, EDIPUCRS, P. 375-400.
- Schartl, M.; Nanda, I.; Schlupp, I.; Wilde, B.; Epplen, J.T.; Schmidt, M.; Parzefall, J. (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*, v. 373, p. 68-71.
- Scheel, J.J. (1972). The chromosomes of the third neon tetra. *Tropical Fish Hobbyist* 20 (11): 60-65.
- Scheel, J.J. (1973). Fish chromosome and their evolution. Interval Report Danmarks Akvarium. 22p.
- Schimid, 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, 1982.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-113.
- Sharbel, T.F.; Green, D.M.; Houben, A. (1998). B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome evolution. *Genome*, v. 41, p. 14-22.
- Souza, I.L. & Moreira-Filho, O. (1992). Divergências cariotípicas entre duas populações de *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae) em diferentes altitudes no rio Piracuama (Bacia do Paraíba). In: IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, p.20.

- Souza, I.L. & Moreira-Filho, O. (1995a). Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia* 60: 1-11.
- Souza, I.L.; Moreira-Filho, O. & Bertollo, L.A.C. (1995b) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) complex. II. Different cytotypes living in sympatry. *Cytologia* 60: 273-281.
- Souza, I.L.; Moreira-Filho, O. & Galetti Jr., P.M. (1996). Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazil. J. Genet.* 19(3): 405-410.
- Stripecke, R.; Nogueira-Pinto, M. T.; Hackel, C.; Sazima, I. O. (1985). O cariotipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 12., Campinas.
- Telenius, H.; Carter, N.P.; Bebb, C.E.; Nordenskyold, M.; Ponder, B.A.; Tunnacliffe, J (1992) *Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerated primer. Genomics., v.8, p. 718-725.*
- Toledo-Filho, A.S.; Foresti, F.; Ribeiro, A.F.(1978). Ictiogenética: Aspectos básicos e aplicados. *Ciência e Cultura*, v.30, p. 320-327.
- Torres-Mariano, A. R. (2001). Descrição citogenética de espécie do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Araguari-Uberlândia (MG). Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)- Univesidade Federal de Uberlândia, 58p.
- Valcarcel, A., Brunner, P., Maggese, M.C., (1993). B-chromosome polymorphism in the South Americamn catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, 110: 111-118.

- Vari, R.P. (1983). Phylogenetic relationship of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithsonian contribution to Zoology* 378:1-58.
- Vari, R.P. & Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. In *Phylogeny and Classification os Neotropical Fishes* (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.p. Vari, Z.M.S. Lucena, eds.) EDIPUCRS, Porto Alegre, p.1-11.
- Vênere, P.C.; Miyasawa, C.S. & Galetti Jr, P.M. (1999) New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 345-349.
- Vicente, V.E. (1994). Estudos do cromossomo B em três populaces de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- Vicente, V.E.;Moreira-Filho, O. & Camacho, P.M. (1996). Sex-ratio distortion associated with the presence of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 74: 70-75.
- Vieira, M. R.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998). Padrões de bandamento G em cromossomos de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da região de Botucatu, SP. Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Netropicais, 7., Londrina.
- Voltolin, T.A. (2008). Origem, Herança e Estrutura dos Cromossomos Supranumerários no Gênero *Prochilodus* (Characiforme, Prochilodontidae). Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 136pp.
- Volubujev, V.T., (1981). B-chromosome systems of the mammals. *Caryologia*, 34: 1-23.

- Wasko AP, Galetti PM (2000) Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology* 23: 135-138.
- Weitzman, S.H. & Fink, W.L. (1983). Relationships of the Neon Tetras, a group of South America freshwater fishes (Teleostei, Characidae) with comments on the phylogeny of New World Characiformes. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 150(6): 339-395.
- White, M.J.D., (1973). *Animal cytology and evolution* 3rd ed. London: Cambridge University Press.
- Wilkes, T.M.; Francki, M.G.; Langidge, P.; Karp, A.; Jones, R.N.; Forster, J.W. (1995). Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome*.
- Williams, S.M.; Strobeck, C. (1985). Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. *Journal of Theoretical Biology*. V.116, p. 625-636.
- Zaret, T.M. & Paine, R.T. (1973). Species introduction in a tropical lake. *Science* v. 182, p. 449-455.
- Zeyl, C.W.; Green, D.M. (1992). Heteromorphism for a highly repeated sequence in the New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. *Evolution*, v. 46, p. 1891-1899.
- Ziegler, C.G., Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Engel, W., Scharl, M., Schmid, M. (2003) The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res.*, 11:23-35.