

CAPÍTULO 3

CONTRIBUIÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA O CONHECIMENTO DOS CROMOSSOMOS DE PEIXES

Pedro Manoel Galetti Junior¹ e Cesar Martins²

¹Departamento de Genética e Evolução – UFSCar

²Departamento de Morfologia – UNESP, Botucatu

As evidências fósseis de uma variedade considerável de metazoários invertebrados como alguns artrópodos, moluscos, braquiópodos e equinodermos, datam do início dos tempos Cambrianos, cerca de 500 milhões de anos. Acredita-se que uma das formas mais simples desses invertebrados deu origem ao primeiro vertebrado por intermédio de um indivíduo relacionado aos tunicados atuais.

Há vários anos, uma questão central tem sido debatida por diversos pesquisadores. Qual seria o tamanho do genoma desses primeiros vertebrados? Esses estudos tiveram seu grande momento em meados da década de 1960. Naquela época, análises em *Ciona intestinalis*, um tunicado, habitante da costa do Pacífico, revelaram a presença de um genoma de tamanho consideravelmente pequeno, correspondente a 6% do genoma médio dos mamíferos placentários (Atkin e Ohno, 1967). No mesmo artigo, os autores relataram o genoma de *Amphioxus lanceolatus*, um Cephalochordata, com cerca de $1,0 \times 10^{-9}$ mg de DNA no lote haplóide, o que corresponde a 15% do observado nos mamíferos placentários ($7,0 \times 10^{-9}$ mg). A partir desses resultados construiu-se uma idéia de que a passagem da forma tunicado à forma anfioxo, que deve ter ocorrido durante o período Ordoviciano ou no Siluriano, foi acompanhada por aumento de duas a três vezes no tamanho do genoma, de 6% para 15% daquele dos mamíferos placentários (Muramoto *et al.*, 1968; Ohno, 1970).

Por representar a base dos vertebrados atuais, acredita-se que os primeiros peixes, habitantes do Ordoviciano há cerca de 450 milhões de anos, teriam um conteúdo de DNA próximo ao tamanho do genoma dos cephalochordatas, algo em torno de 20% do valor observado no genoma dos mamíferos placentários atuais

(revisão em Ohno, 1974). Hoje, já se conhece o conteúdo de DNA de inúmeros representantes de todos os grandes grupos de peixes atuais, incluindo representantes de nossa ictiofauna (Oliveira *et al.*, 2000). Embora se observem amplos limites de variação desses valores quando os peixes são vistos em seu todo, a maioria dos taxons possui 1,0 a $3,0 \times 10^{-9}$ mg de DNA por núcleo haplóide, corroborando a possibilidade de esses valores estarem presentes nos grupos ancestrais.

A partir do debate sobre o conteúdo de DNA presente no genoma ancestral, surge uma nova questão relativa à organização genômica dos peixes. Qual seria a composição cromossômica dos primeiros peixes ancestrais? Em paralelo à quantidade de DNA presente nas células, há também ampla diversidade de números cromossômicos e formas cariotípicas nos peixes. O valor diplóide varia de 22-26 em algumas espécies de peixes Antárticos (Ozouf-Costaz *et al.*, 1997) a mais de 250 em esturjões (Ascipenceridae) (Fontana *et al.*, 2001). A maioria, entretanto, varia de $2n = 44$ a $2n = 60$ (Oliveira *et al.*, 2000). Uma hipótese clássica resultante dos trabalhos citados anteriormente de Ohno e colaboradores propõe que os primeiros peixes teriam um cariótipo formado por $2n = 48$ cromossomos do tipo acrocêntricos. Esse cariótipo, entretanto, parece ter surgido somente com os chamados neoteleosteos, que representam a maioria dos grupos atuais (Brum e Galetti, 1997); representantes de grupos mais antigos, como os tubarões, por exemplo, mostram um cariótipo próximo de 60 cromossomos, com alguns microcromossomos.

Qualquer que tenha sido a constituição cromossômica dos peixes ancestrais, a resultante atual é uma extensa diversidade de formas cariotípicas e, neste capítulo, vamos apresentar alguns elementos obtidos a partir de análises modernas de hibridização *in situ*, as quais têm permitido novas interpretações dessa diversidade, em particular sobre a origem de cromossomos sexuais e de cromossomos supernumerários e sobre a organização genômica de segmentos cromossômicos específicos, como as regiões centroméricas, teloméricas e os sítios ribossomais.

DNA SATÉLITE, CROMOSSOMOS SEXUAIS E CROMOSSOMOS SUPERNUMERÁRIOS EM PEIXES

Diferentes aspectos do DNA satélite de muitos invertebrados, bem como de mamíferos, já foram extensivamente abordados por inúmeros autores. Em peixes, entretanto, ainda é pequeno o número de informações que se tem a respeito da organização molecular dessa fração do genoma e de sua localização cromossômica, especialmente se for considerado o grande número de espécies existentes nas águas

continentais e marinhas (Tabela 3.1), embora a distribuição e localização da fração heterocromática, na qual se supõe estar concentrada boa parte do DNA satélite, já tenham sido largamente estudadas por métodos citológicos de coloração ou de bandeamentos cromossômicos, em muitas espécies. As primeiras descrições de famílias de DNAs satélite nesse grupo de vertebrados foram realizadas no final da década de 1980 (Datta *et al.*, 1988; Moyer *et al.*, 1988; Monaco *et al.*, 1989). As informações apresentadas na Tabela 3.1 mostram que as seqüências satélites identificadas até o momento encontram-se localizadas principalmente na região centromérica dos cromossomos e, como mostrado para outros organismos, devem desempenhar papel importante na estrutura e função do centrômero dos peixes.

Atenção particular tem sido direcionada às seqüências repetitivas ligadas ao sexo em espécies de peixes. DNAs satélite têm sido isolados e mapeados nos cromossomos de diversas espécies, incluindo *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.*, 1994), *Chiondraco hamatus* (Capriglione *et al.*, 1994), *Poecilia reticulata* (Nanda *et al.*, 1990) e *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 2001).

A família dos guarus (*guppies*) Poeciliidae representa um grupo particularmente interessante em relação à determinação sexual, porque algumas espécies apresentam heterogametia feminina enquanto espécies próximas apresentam heterogametia masculina. Em ambos os casos, entretanto, os cromossomos sexuais não são diferenciados em coloração convencional, mostrando-se similares na forma e no tamanho. Contudo, o bandeamento C e a FISH mostraram um grande bloco heterocromático na região telomérica dos cromossomos W e Y, rico em DNA repetitivo e reduzido nos respectivos Z e X, sugerindo que o surgimento e o desenvolvimento dessa heterocromatina tenham sido os primeiros passos na diferenciação citológica desses cromossomos (Haaf e Schmid, 1984, Nanda *et al.*, 1990, 1992).

No grupo dos salmonídeos, em que os cromossomos X e Y heteromórficos também são de difícil identificação, já foram identificadas algumas seqüências de DNA marcadoras de sexo. Por exemplo, Devlin *et al.* (1991, 1998) e Stein *et al.* (2001) isolaram e caracterizaram uma seqüência de DNA repetitiva de 8 kb específica do cromossomo Y do salmão *O. tshawytscha*. Essa seqüência encontra-se repetida cerca de 300 vezes no genoma dessa espécie e está organizada em aproximadamente seis agrupamentos separados (Devlin *et al.*, 1998). Ao contrário do observado para diversos eucariontes, em que seqüências repetitivas longas se originaram da duplicação de unidades repetitivas menores, a repetição de 8 kb de salmão não apresenta resquícios internos de repetições menores.

Tabela 3.1 Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de DNAs satélite nos cromossomos dos peixes.

Famílias e espécies	Tamanho das repetições (pb)	Localização cromossômica	Conteúdo de AT (%)	Referências
Acipenseridae				
<i>Acipenser naccarii</i>	180	centromérica		Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1997; Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	180	centromérica		Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser baerii</i>	180	centromérica		Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser transmontanus</i>	180	centromérica		Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenserruthenus</i>	180	centromérica		Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Huso huso</i>	180	centromérica		Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
Anostomidae				
<i>Leporinus elongatus</i>	174, 729	cromossomos Z e W		Nakayama <i>et al.</i> , 1994
<i>Leporinus obtusidens</i>	483	pericentromérica	60	Koehler <i>et al.</i> , 1997
Centropomidae				
<i>Centropomus mexicanus</i>	310	centromérica	63	Netto, 2000
Channichthyidae				
<i>Chionodraco hamatus</i>	1000	centromérica e telomérica		Capriglione <i>et al.</i> , 1994
Characidae				
<i>Astyanax scabripinnis</i>	51	heterocromatinas terminais	59	Mestriner <i>et al.</i> , 2000
Cichlidae				
<i>Oreochromis mossambicus/homorum</i>	237	–		Wright, 1989
<i>Oreochromis homorum</i>	760			Frank e Wright, 1993
<i>Oreochromis spp</i>	209–238			Wright, 1989; Frank e Wright, 1993
<i>Oreochromis niloticus</i>		centromérica		Franck <i>et al.</i> , 1992; Frank e Wright, 1993; Oliveira e Wright, 1998
<i>Tilapia rendalli</i>	237			Franck <i>et al.</i> , 1992
<i>Tilapia zilli</i>	238			Franck <i>et al.</i> , 1992
<i>Sarotherodon galileus</i>	236			Wright, 1989
Cyclostomata				
<i>Eptatretus okinoseanus</i>	90	intersticial		Kubota <i>et al.</i> , 1993
<i>Eptatretus burgeri</i>	57 e 64	intersticial		Kubota <i>et al.</i> , 2001
<i>Petromyzon sp</i>		centromérica e pericentromérica		Bóan <i>et al.</i> , 1996
Cyprinidae				
<i>Cyprinus carpio</i>	245	–		Datta <i>et al.</i> , 1988
<i>Cirrhina mrigala</i>				Padhi <i>et al.</i> , 1998

Tabela 3.1 Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de DNAs satélite nos cromossomos dos peixes. (*Continuação.*)

Famílias e espécies	Tamanho das repetições (pb)	Localização cromossômica	Conteúdo de AT (%)	Referências
Cyprinidae				
<i>Aristichthys nobilis</i>				Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>				Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>				Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Notropis lutrensis</i>	174			Moyer <i>et al.</i> , 1988
Erythrinidae				
<i>Hoplias malabaricus</i>	333-366	centromérica	67	Haaf <i>et al.</i> , 1993
Gadidae				
<i>Pollachius virens</i>	200			Denovan e Wright, 1990
Parodontidae				
<i>Parodon hilarii</i>	200	terminal		Vicente, 2001
Poeciliidae				
<i>Danio rerio</i>	180, 191	centromérica	65, 72	Ekker <i>et al.</i> , 1992; He <i>et al.</i> 1992; Sola e Gornung, 2001
<i>Danio rerio</i>	176 e 178	paracentromérica	45	Phyllips e Reed, 2000
<i>Cyprinodon variegatus</i> <i>Poecilia formosa</i>	170			Turner <i>et al.</i> , 1991 Monaco <i>et al.</i> , 1989
Prochilodontidae				
<i>Prochilodus lineatus</i>	441 e 900	centromérica	57	Jesus <i>et al.</i> , 2003
Salmonidae				
<i>Salvelinus alpinus</i>	72, 127, 200, 400	centromérica, telomérica, intersticial, DNAr		Hartley e Davidson, 1994
<i>Salvelinus namaycush</i>		centromérica, telomérica e intersticial		Reed e Phillips, 1995b
<i>Salmo trutta</i>	359	RON		Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	380, 442, 923	RON, DNAr		Goodier e Davidson, 1994; Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	939	subtelomérica		Stevens <i>et al.</i> , não publicado
Sparidae				
<i>Sparus aurata</i>	186	centromérica	67	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1994
<i>Pagrus pagrus</i>		subtelomérica		Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagrus aurica</i>		subtelomérica		Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagellus erythrinus</i>		subtelomérica e telomérica		Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
Tetraodontidae				
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	118	centromérica	57,6	Crollius <i>et al.</i> , 2000
<i>Fugu rubripes</i>	118	centromérica		Brenner <i>et al.</i> , 1993; Elgar <i>et al.</i> , 1999

Cromossomos sexuais claramente diferenciados na morfologia ocorrem em algumas espécies de peixes. Dentre estas destacam-se as espécies do gênero *Leporinus*, no qual as fêmeas possuem um único e grande cromossomo subtelocêntrico (W), ausente no cariótipo dos machos (Galetti *et al.*, 1995). Duas famílias de DNAs satélite sexo-específicas foram isoladas da piapara *L. elongatus*, por hibridização subtrativa e clonagem (Nakayama *et al.*, 1994). Pelo método FISH, uma dessas famílias foi localizada em ambos os cromossomos Z e W, enquanto a outra parece específica do cromossomo W. As seqüências dessas duas famílias não mostram homologia clara com qualquer outra seqüência conhecida. Três indivíduos atípicos, uma fêmea ZW reconhecida como macho pela sonda W-específica e dois machos não usuais ZW, um deles apresentando padrões de hibridização de machos, foram detectados nessas análises. Esses três indivíduos podem ter sido resultado de uma troca genética entre regiões dos cromossomos Z e W, originando os padrões atípicos observados. A co-localização de ambos os satélites permitiu a construção de um modelo de diferenciação do cromossomo W com importantes contribuições para a compreensão da origem de sistemas de determinação sexual em peixes.

Recentemente, Vicente (2001) fez a caracterização molecular de um DNA satélite obtido no canivete *Parodon hilarii*, uma espécie da família Parodontidae que também possui cromossomos sexuais Z e W altamente diferenciados. A FISH identificou o DNA satélite presente na região terminal de alguns cromossomos do complemento, incluindo os cromossomos sexuais, que pode estar evoluindo por um processo de homogeneização, como parece geralmente ocorrer com as seqüências centroméricas, independente de sua localização.

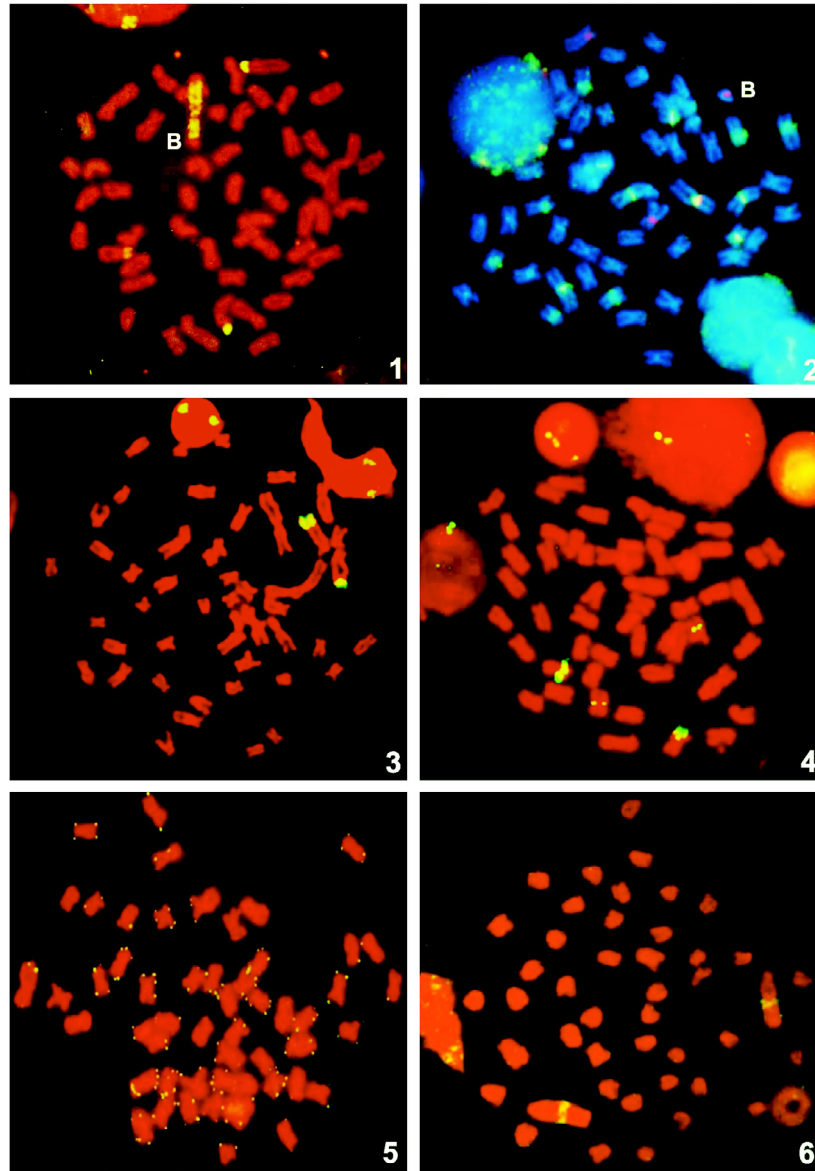
Outro problema interessante investigado nos peixes tem sido a presença de cromossomos supernumerários (ou Bs) que aparecem em diversas espécies. Uma espécie-modelo nos estudos citogenéticos é o lambari *Astyanax scabripinnis*, que além da presença de cromossomos supernumerários, apresenta também variações numéricas e estruturais. Foi nessa espécie que pela primeira vez foi descrita parte da composição genética do DNA presente em um cromossomo B de peixe (Mestriner *et al.*, 2000). Nesse estudo, os autores isolaram e caracterizaram uma família de DNA satélite (As51) presente em uma população portadora de cromossomo B. O satélite isolado apresentava repetições de 51 pares de bases (pb) e estava presente nas heterocromatinas não centroméricas, nas RONS e no cromossomo B da população estudada (Figura 3.1). A maioria dos cromossomos B cuja composição nucleotídica foi analisada tem mostrado que eles contêm principalmente DNA repetitivo, o que está relacionado à natureza heterocromática da maioria desses cromossomos. Além disso, a distribuição não centromérica para

o DNA satélite de *A. scabripinnis* representa situação diferenciada para os peixes, nos quais os DNAs satélite têm sido detectados em sua maior parte nos centrômeros (Tabela 3.1). Curiosamente, a seqüência satélite de *A. scabripinnis* apresentou 58,8% de similaridade com uma porção do retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* e menor homologia com o gene da transposase do transposon TN4430 do *Bacillus thuringiensis*, sugerindo que essa seqüência pode ter surgido a partir de um elemento transponível de DNA. A presença desse satélite co-localizado com as RONS sugere que essa seqüência repetitiva pode estar presente nos espaçadores do DNAr 45S, tendo sido inserida nessas regiões por transposição, como já verificado para outros organismos.

Cabe destacar que, embora a FISH tenha detectado marcações fluorescentes ao longo de quase toda a extensão do cromossomo B, foi possível verificar que o DNA satélite As51 forma pequenos agrupamentos ao longo desse cromossomo (Figura 3.1), entre os quais há regiões com outros tipos de DNAs ainda não identificados. A distribuição simétrica do As51 nos dois braços do cromossomo B, associada ao comportamento meiótico desse cromossomo, sugere fortemente que se trata de um isocromossomo (Mestriner *et al.*, 2000).

Outra espécie de peixe-modelo bastante interessante é o curimatá *Prochilodus lineatus*, que apresenta 54 cromossomos meta- e submetacêntricos e pequenos cromossomos supernumerários que podem variar de 0 a 5 por célula diplóide (Pauls e Bertollo, 1983). Duas famílias de DNAs satélite (unidades monoméricas de 441 e 900 pb) foram isoladas dessa espécie (Jesus *et al.*, 2003). O satélite de 900 pb estava presente na região pericentromérica de diversos cromossomos do complemento A, assim como em diversos cromossomos supernumerários. O satélite de 441 pb também foi mapeado na região pericentromérica de diversos cromossomos do complemento A, sendo co-localizado com o DNA satélite anterior em alguns desses cromossomos, mas ausente nos cromossomos supernumerários (Figura 3.2). Diversas sub-repetições foram observadas dentro do satélite de 900 pb, sugerindo sua origem a partir de unidades repetitivas menores. Tais resultados possibilitaram inferir sobre uma possível origem dos cromossomos supernumerários dessa espécie, que parecem ser originados de seu próprio complemento A, a partir de cromossomos portadores do satélite de 900 pb (Jesus *et al.*, 2003).

A presença constante de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais e supernumerários das espécies de peixes reforça a idéia de que estudos objetivando o isolamento e a caracterização da organização genômica dessas seqüências representam fontes certas e seguras na obtenção de respostas sobre a origem e evolução desses tipos cromossômicos, amplamente distribuídos nos peixes.



Figuras 3.1 a 3.6 Localização do DNA satélite As51 em *Astyanax scabripinnis* (3.1) indicando o macrocromossomo B. Co-localização de duas seqüências satélites obtidas por duplo-FISH em *Prochilodus lineatus* (3.2) indicando um microcromossomo B. Localização dos genes RNAr 45S em uma espécie de *Brycon lundii* (3.3) e sítios de DNAr 5S em um *Leporinus* (3.4). FISH com a sonda de 194 pb que contém o microsatélite (AATTT)₁₀ em *Prochilodus lineatus* (3.5) e com a sonda do SINE Ron1 de *Oreochromis niloticus* evidenciando marcação no cromossomo 1 (3.6). Fotos gentilmente cedidas por Carlos A Mestriner (3.1), Célia M de Jesus (3.2), Adriane P Wasko (3.3) e Terumi Hatanaka (3.5).

GENES RIBOSSOMAIS

A distribuição dos sítios cromossômicos de DNAr 45S nos peixes tem sido amplamente estudada por intermédio da impregnação com nitrato de prata. Os primeiros registros de estudos de RONS em peixes foram feitos por Galetti (1979), que localizou e analisou a diversidade dessas regiões cromossômicas em 8 espécies de piavas anostomídeos, e por Foresti *et al.* (1981), que verificaram acentuado polimorfismo dessas regiões em uma espécie de espadinha do grupo Gimnotiformes. Inúmeros outros trabalhos que se seguiram mostraram diferentes aspectos relacionados com esses sítios cromossômicos em praticamente todos os grandes grupos de peixes. Um dos aspectos recorrentes desses estudos é o fato de que a técnica de coloração pelo nitrato de prata tem sido considerada um método indireto de localização das RONS, uma vez que a prata se associa a proteínas nucleolares envolvidas com a atividade transcricional dos genes ribossomais e não diretamente ao DNAr (Miller *et al.*, 1976), portanto, grande parte da variação detectada, seja intra- ou interindividual, ou interespecífica, pode estar associada à atividade desses cistrons. Mais recentemente, o uso da coloração com compostos fluorocromos GC específicos, como a mitramicina A (MM) e a cromomicina A₃ (CMA₃), mostrou estreita relação entre as RONS evidenciadas pelo nitrato de prata e as regiões coradas por esses fluorocromos nos cromossomos de peixes (Galetti e Rasch, 1993; Mestriner *et al.*, 1995; entre outros).

Na maioria das vezes, todos os sítios de RONS dos cromossomos de peixes, mesmo aqueles usualmente não detectados pelo nitrato de prata, são evidenciados fortemente brilhantes pela mitramicina ou cromomicina, como é característico das marcações positivas dos compostos fluorocromos. Entretanto, essa relação não é absoluta. Há muitos casos nos peixes em que a CMA₃ evidencia sítios adicionais aos mostrados pela prata. Por outro lado, sítios detectados pelo nitrato de prata e não pela CMA₃ também já foram descritos para espécies de peixes (Mandrioli *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001). Objetivando determinar claramente se sítios CMA₃ representam de fato sítios de DNAr 45S ou apenas heterocromatinas ricas em GC, hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S tem sido realizada em diversas espécies de peixes (Figura 3.3), como, por exemplo, na piava *Leporinus friderici* (Galetti *et al.*, 1995), na espadinha do gênero *Eigenmannia* (Almeida-Toledo *et al.*, 1996) e em taguaras do gênero *Schizodon* (Martins e Galetti, 1998).

Mandrioli *et al.* (2001), estudando *Gobius niger* (Gobiidae), identificaram sítios positivos à prata e à hibridização com sondas de DNAr 45S, mas que se mostravam negativos à coloração com o fluorocromo CMA₃. Estudos conjugados de bandejamento C, coloração com nitrato de prata e fluorocromos GC específicos e FISH com sondas de DNAr 45S em *A. scabripinnis* têm fornecido importantes dados sobre a organização das RONS nos peixes. Sítios de DNAr 45S, não evidenciados

por fluorocromos GC específicos, também foram observados nessa espécie (Souza *et al.*, 2001). Ao contrário do observado por Mandrioli *et al.* (2001), as RONS CMA₃ negativas de *A. scabripinnis* mostraram-se negativas também à coloração com nitrato de prata, sendo evidenciadas apenas pela FISH. Agrupamentos de DNAr 45S negativos à prata sugerem que esses segmentos de DNA não apresentam atividade transcricional perceptível pela coloração com prata ou podem estar representando resquícios não funcionais de segmentos de DNAr 45S.

Nos eucariotos superiores, arranjos em tandem dos genes RNA ribossomais estão organizados em duas famílias multigênicas distintas compostas por centenas a milhares de cópias. Uma família é representada pelo DNAr 45S que codifica os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 26S/28S e a outra é representada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S, um dos componentes da subunidade maior dos ribossomos. O arranjo do DNAr 5S consiste em seqüências codificantes de 120 pb que são separadas umas das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS).

Ao contrário do DNAr 45S, que pode ser localizado pelo tratamento com nitrato de prata e coloração com fluorocromos, a identificação dos sítios genômicos do DNAr 5S só pode ser realizada por hibridização *in situ*. Curiosamente, o mapeamento dos genes RNAr 5S em diversas espécies de peixes tem evidenciado esses sítios comumente localizados nos segmentos intersticiais dos cromossomos (Tabela 3.2), como observado em espécies de salmonídeos (Fujiwara *et al.*, 1998), anostomídeos (Martins e Galetti, 1999, 2000, 2001a), parodontídeos (Vicente *et al.*, 2001), na traíra *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000) e na tilápia *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2000). Esse mesmo padrão de localização cromossômica para os genes RNAr 5S também foi observado para mamíferos (Frederiksen *et al.*, 1997, Zijlstra *et al.*, 1997; entre outros) e anfíbios (Lucchini *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1987). Tal padrão de localização cromossômica parece não ser casual, e a distribuição intersticial para os genes RNAr 5S pode estar representando alguma vantagem relacionada à organização desses genes no genoma dos vertebrados.

Nos peixes anostomídeos, os genes RNAr 5S estão presentes em dois locos cromossômicos (Martins e Galetti, 1999, 2000, 2001a). Esses sítios cromossômicos de DNAr 5S têm-se mantido conservados durante a diversificação cariotípica dos anostomídeos, uma vez que cromossomos homólogos carregando sítios DNAr 5S foram detectados em diversas espécies de *Leporinus*, *Schizodon* e *Leporellus* (Martins e Galetti, 1999, 2000, 2001a; Aguilar, 2001). Além disso, os dois locos detectados em Anostomidae parecem estar situados em cromossomos homeólogos no gênero *Parodon* (Parodontidae) (Vicente *et al.*, 2001; Centofante *et al.*, 2002) e em *Prochilodus* (Prochilodontidae) (Hatanaka, 2001), sugerindo que os eventos de evolução mantiveram os ambientes cromossômicos portadores dos locos de DNAr 5S conservados nessas diferentes famílias.

Tabela 3.2 Compilação de dados relacionados à localização cromossômica de DNAr 5S nos cromossomos dos peixes.

Ordens e espécies	Número de locos de DNAr 5S	Localização cromossômica do DNAr 5S	Sintenia dos locos DNAr 5S e 45S	Referências
Acipenseriformes				
<i>Acipenser naccarii</i>	4	intersticial/ terminal	0	Fontana <i>et al.</i> , 1999
<i>Acipenser ruthenus</i>	2	terminal	0	Fontana <i>et al.</i> , 1999
<i>Acipenser sturio</i>	2	intersticial	0	Tagliavini <i>et al.</i> , 1999
<i>Huso huso</i>	2	terminal	0	Fontana <i>et al.</i> , 1998
Anguilliformes				
<i>Anguilla anguilla</i>	2	intersticial	–	Martínez <i>et al.</i> , 1996
<i>Anguilla rostrata</i>	2	intersticial	–	Nieddu <i>et al.</i> , 1998
Salmoniformes				
<i>Coregonus artedii</i>	2	intersticial	–	Sajdak <i>et al.</i> , 1998
<i>Coregonus zenithicus</i>		intersticial	–	Sajdak <i>et al.</i> , 1998
<i>Hucho perryi</i>	2	intersticial	–	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus masou</i>	8	intersticial	+	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	6	intersticial	+	Móran <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	3–4	intersticial	+	Pendás <i>et al.</i> , 1994a
<i>Salmo trutta</i>	2	intersticial	–	Móran <i>et al.</i> , 1996
<i>Salvelinus fontinalis</i>	2	intersticial	–	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
Cypriniformes				
<i>Acheilognathus tabira</i>	4	intersticial/ terminal	+	Inafuku <i>et al.</i> , 2000
<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	2	0	0	Murakami e Fugitani, 1998
<i>Cyprinus carpio</i>	4	intersticial	–	Inafuku <i>et al.</i> , 2000
<i>Danio rerio</i>	2	intersticial	+	Phillips e Reed, 2000
<i>Rhodeos ocellatus</i>	2	intersticial	–	Kikuma <i>et al.</i> , 2000
Characiformes				
<i>Astyanax scabripinnis</i>	8	intersticial	–	Ferro <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon lundii</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon microlepis</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon orbignyianus</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon cephalus</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon</i> sp.	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon brevicauda</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon insignis</i>	4	intersticial	–	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Hoplias malabaricus</i>	2	intersticial	–	Born e Bertollo, 2000
<i>Leporinus cf. elongatus</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2001a

Tabela 3.2 Compilação de dados relacionados à localização cromossômica de DNAr 5S nos cromossomos dos peixes. (Continuação.)

Ordens e espécies	Número de locos de DNAr 5S	Localização cromossômica do DNAr 5S	Sintenia dos locos DNAr 5S e 45S	Referências
Characiformes				
<i>Leporinus elongatus</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 1999
<i>Leporinus frederici</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 1999
<i>Leporinus obtusidens</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 1999
<i>Leporinus reinhardti</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2001a
<i>Parodon hilarii</i>	4	intersticial	–	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Parodon tortuosus</i>	4	intersticial	–	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Parodon</i> sp	4	intersticial	–	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Schizodon altoparanae</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
<i>Schizodon borelli</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
<i>Schizodon isognathum</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
<i>Schizodon knerii</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
<i>Schizodon nasutus</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
<i>Schizodon vittatus</i>	4	intersticial	–	Martins e Galetti, 2000
Perciformes				
<i>Coris julis</i>	4	terminal	+	Mandrioli <i>et al.</i> , 2000
<i>Ephinephelus marginatus</i>	2	intersticial	–	Sola <i>et al.</i> , 2000
<i>Micropterus salmoides</i>	2	intersticial	–	Deiana <i>et al.</i> , 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	4	intersticial	–	Martins <i>et al.</i> , 2000
<i>Chromis insolata</i>	4	terminal	–	Molina e Galetti, 2002
<i>Chromis flavicauda</i>	4	intersticial	–	Molina e Galetti, 2002
Tetraodontiformes				
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	2	terminal	–	Mandrioli e Manicardi, 2001
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	2	intersticial	–	Fischer <i>et al.</i> , 2000

(0) não descrito; (+) localização sintênica; (–) localização não-sintênica.

Situação similar foi observada no lambari *A. scabripinnis*, que tem apresentado acentuada variabilidade cromossômica, incluindo os sítios de DNAr 45S (Mantovani *et al.*, 2000). Apesar dessa extensa variabilidade, os sítios cromossômicos de DNAr 5S apresentam-se conservados em diversas populações dessa espécie (Mantovani, 2001). Além disso, sítios homólogos de DNAr 5S foram detectados para diversas espécies de *Astyanax* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002), mostrando que o padrão de conservação para os locos de DNAr 5S pode representar uma tendência geral para os peixes. Esses resultados podem estar relacionados à localização cromossômica do DNAr – enquanto os locos de DNAr 45S estão situados em posições terminais, os sítios de DNAr 5S ocupam posição intersticial nos cromossomos de quase todas as espécies de peixes estudadas. Em *Astyanax*, por exemplo, as regiões terminais dos cromossomos são heterocromáticas, o que facilitaria eventos de transposição, levando

à dispersão desses segmentos no genoma, porém, por sua localização interna, os sítios de DNAr 5S podem estar protegidos de tais eventos (Mantovani, 2001). A conservação dos sítios de DNAr 5S *versus* maior variação no DNAr 45S entre os peixes parece representar regra geral também para outros vertebrados. Tal padrão cromossômico de distribuição do DNAr 5S mostra que o ambiente intersticial das cromátides pode estar protegido de eventos evolutivos, como a transposição por exemplo, que poderiam atuar na dispersão de seqüências que estão localizadas em posição terminal dos cromossomos. Um caso interessante, entretanto, de modificações cromossômicas envolvendo sítios 5S foi recentemente descrito em duas espécies de peixes de recifes de corais pertencentes ao gênero *Chromis*. Em *C. insolata* ($2n=46-47$), os genes 5S foram detectados na região telomérica de dois cromossomos acrocênticos, enquanto em *C. flavicauda* ($2n=39$) esses genes foram identificados na região pericentromérica de cromossomos metacêntricos, sugerindo que o DNAr 5S esteve envolvido em rearranjos Robertsonianos nesses peixes (Molina e Galetti, 2002).

Também é interessante destacar que os genes 5S e 45S estão freqüentemente situados em arranjos independentes e em ambientes cromossômicos distintos para a maioria das espécies, o que parece representar o cenário mais comum para o arranjo dos genes ribossomais nos peixes. Localização cromossômica independente para os sítios 5S e 45S também representa a situação mais freqüentemente observada em outros vertebrados (Lucchini *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996). Embora em algumas espécies de peixes como os salmões *Salmo salar* e *Oncorhynchus mykiss* (Pendás *et al.*, 1994a; Mórán *et al.*, 1996) os sítios 5S e 45S possam estar ligados em um mesmo cromossomo, a localização cromossômica independente para esses sítios parece representar condição ótima que evita interferências na harmonia desses sítios de múltiplas cópias, como, por exemplo, uma translocação indesejada de seqüências 5S dentro do arranjo 45S, ou vice-versa (Martins e Galetti, 1999).

Estudando diversas espécies de *Leporinus* por intermédio da construção e triagem de bibliotecas subgenômicas, PCR, clonagem, hibridização cromossômica e hibridização de DNA imobilizado em membrana, Martins e Galetti (2001a) demonstraram que locos situados em diferentes cromossomos do complemento possuam unidades repetitivas distintas de DNAr 5S. Essas unidades distintas representam dois tipos de arranjos monoméricos para os genes 5S: um menor, com monômeros de 200 pb, e outro maior, que apresentou monômeros de 900 pb (Figura 3.7). Comparando-se cópias gênicas dos diferentes monômeros (200 pb e 900 pb), foi possível concluir que as repetições do gene RNAr 5S são quase idênticas dentro de um mesmo arranjo e apresentam pequenas diferenças, relacionadas a poucas substituições de bases, quando seqüências do gene são comparadas entre as duas classes. A grande diferença entre essas duas classes estava na presença de NTSs completamente distintas, presentes em cada uma das classes. Curiosamente, os

genes RNAr 5S estavam presentes em dois locos situados em cromossomos distintos, e a utilização de sondas livres do gene 5S, contendo apenas o NTS do monômero de 200 pb e o NTS do monômero de 900 pb, mostrou que cada um dos tipos de NTS estava presente de forma individualizada em cada um dos locos cromossômicos identificados para os genes RNAr 5S (Figura 3.7). Dois locos para o DNAr 5S foram observados para diversos anostomídeos estudados (Martins e Galetti, 1999, 2000, 2001a). Embora os sítios cromossômicos de DNAr 5S tenham se mantido conservados durante a diversificação cariotípica dos anostomídeos (Figura 3.4), parece ter ocorrido mudanças internas no arranjo desses genes.

Na tilápia, *O. niloticus*, duas unidades diferentes de DNAr 5S foram caracterizadas pela presença de distintos tipos de NTSs relacionados a substituições de bases e inserções/deleções e poucas substituições de bases no gene 5S (Martins *et al.*, 2000). Situação similar foi também descrita para sete espécies do gênero *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001), *S. salar* (Pendás *et al.*, 1994a), *O. mykiss* (Móran *et al.*, 1996) e para o gênero *Coregonus* (Sajdak *et al.*, 1998). Em uma investigação mais recente (Martins *et al.*, 2002), foi observado que as duas classes de DNAr 5S presentes no genoma da tilápia apresentavam arranjo bastante particular. Numa classe, esse sítio mostrava arranjo comum formado por uma cópia do gene RNAr 5S e seu NTS e estava presente em dois locos cromossômicos. A outra classe apresentava duas cópias do gene RNAr 5S, sendo uma delas invertida, e um pseudogene de RNAr 5S entre essas duas cópias, e ocupava um único loco cromossômico (Martins *et al.*, *in press*). Esses resultados de tilápia ilustram o intenso dinamismo com que esses elementos repetitivos codificadores de RNAr 5S têm evoluído, levando ao surgimento das variações observadas.

Diferentes classes de DNAr 5S também já foram descritas para diversas espécies de mamíferos (Hart e Folk, 1982; Hallemborg *et al.*, 1994; Frederiksen *et al.*, 1997), mas informações sobre variantes de DNAr 5S e sua localização genômica somente foi descrita para ratos, nos quais genes RNAr 5S verdadeiros e pseudogenes estão presentes em diferentes cromossomos (Frederiksen *et al.*, 1997), e mais recentemente, para peixes (Martins e Galetti, 2001a; Martins *et al.*, 2002).

Duas famílias de genes RNAr 5S, diferentemente reguladas em células somáticas e ovócitos, têm sido descritas em anfíbios e peixes (Komiya *et al.*, 1986). Essas classes de DNAr 5S apresentam poucas diferenças na seqüência da região codificante, mas diferem grandemente em seus espaçadores. As duas classes de DNAr 5S identificadas nos peixes podem estar relacionadas a esse sistema duplo, representando cópias parálogas do gene RNAr 5S que têm evoluído em regiões genômicas distintas.

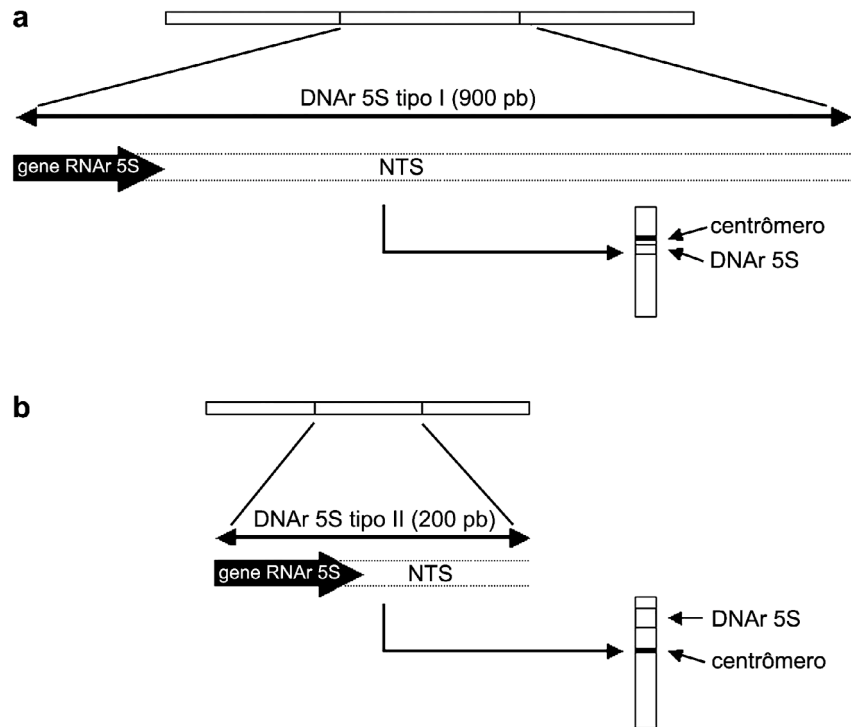


Figura 3.7 Organização genômica do DNAr 5S em *Leporinus* com base em Martins e Galetti (2001a): a e b representam diagramas da organização genômica das duas classes de DNAr 5S. À direita da figura são mostrados idiogramas destacando a organização cromossômica das duas classes de DNAr 5S. Outros detalhes são fornecidos no texto.

Essas classes de DNAr 5S observadas em alguns peixes parecem representar unidades evolutivas independentes que podem estar expressando dois tipos diferentes de genes RNAr 5S. Dois arranjos independentes para o DNAr 5S parecem representar uma característica compartilhada pelos peixes de uma forma geral (Martins e Galetti, 2001b). Essas descobertas sobre a organização cromossômica do DNAr 5S abre novas perspectivas para a compreensão da dinâmica dos elementos repetitivos no genoma.

ESTUDOS ENVOLVENDO OUTRAS SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS

Diversos outros tipos de elementos repetitivos de DNA, como genes de histonas, SINES, LINES e repetições teloméricas, têm sido estudados em relação a sua localização nos cromossomos dos peixes. Embora algumas dessas seqüências tenham sido muito estudadas quanto à seqüência nucleotídica e alguns aspectos da organização genômica, poucos são os trabalhos acerca de sua localização nos cromossomos dos peixes.

Entre esses elementos repetitivos, a organização cromossômica da família multigênica de histonas foi estudada apenas em truta marrom, truta arco-íris e salmão do Atlântico (Pendás *et al.*, 1994b), mostrando-se arranjados em um único loco nessas espécies.

Vertebrados, de peixes a humanos, compartilham uma seqüência repetitiva telomérica, (TTAGGG)_n, comum. Embora a localização cromossômica dessas repetições em diversas espécies de peixes mostre sua distribuição primária nos telômeros (Meyne *et al.*, 1990; Chew *et al.*, 2002), alguns sítios não teloméricos também tem sido observados (Reed e Phillips, 1995a). Em algumas espécies de trutas e salmões (*Salmo trutta*, *S. salar*, *Onchorhynchus kisutch* e *O. mykiss*), por exemplo, a hibridização *in situ* localizou seqüências teloméricas em regiões correspondentes as RONS (Abuín *et al.*, 1996), sugerindo que os elementos teloméricos estavam dispersos ao longo da região da RON.

Em adição, sob condições de baixa estringência, foi possível identificar sítios teloméricos intersticiais em um par cromossômico de *S. salar*, sugerindo que possíveis eventos de fusão ocorreram durante a evolução da espécie (Abuín *et al.*, 1996). Sítios teloméricos intersticiais também foram detectados na tilápia *O. niloticus*, sugerindo eventos de fusões cromossômicas (Chew *et al.*, 2002). A presença de sítios teloméricos intersticiais resultados de fusões cromossômicas não são facilmente detectados, uma vez que essas seqüências se modificam rapidamente após a fusão, provavelmente como decorrência da perda da função de telômero. Recentemente, Hatanaka e Galetti (2002) identificaram um microssatélite pentanucleotídeo (AATTT)_n no curimatá *P. lineatus* que se assemelha à seqüência telomérica dos vertebrados.

Utilizando em FISH de baixa estringência uma sonda de 194 pb contendo em seu interior 10 repetições do citado microssatélite, os autores identificaram marcações preferenciais em todos os telômeros do complemento (Figura 3.5), o que também contribui para evidenciar sua semelhança molecular com a seqüência telomérica.

Entre os peixes, fragmentos contendo seqüências similares a SINES e LINES têm sido descritos para diversas espécies. No entanto, os estudos sobre a distribuição de SINES e LINES nos cromossomos dos peixes estão apenas começando. Experimentos de FISH com um elemento LINE parcial de tilápia, *O. niloticus*, mostrou que todos os cromossomos exibiram sinais muitos pequenos distribuídos aleatoriamente ao longo das cromátides, estando mais concentrados nos dois terços finais do braço longo do cromossomo 1 (Oliveira *et al.*, 1999).

Além disso, experimentos de FISH com um elemento SINE, denominado Ron1 (Figura 3.6), mostraram que uma grande porção intersticial do braço longo do cromossomo 1 continha esta seqüência (Martins *et al.*, dados não publicados). Considerando que os cromossomos de tilápia não apresentam bandas longitudinais com os fluorocromos CMA₃ e DAPI e a distribuição cromossômica dos elementos SINE e LINE, Oliveira *et al.* (2002) sugeriram que a ausência de bandas longitudinais eucromáticas nos cromossomos de tilápia reflete a ausência de agrupamentos de grande número de LINEs AT-ricos e SINEs GC-ricos.

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES DE CÓPIA SIMPLES

A localização cromossômica de seqüências de cópia simples tem sido pouco realizada em peixes, em decorrência da dificuldade na geração de sinal a partir da hibridização de sondas representadas por uma pequena seqüência de DNA e que não se encontra repetida no genoma. Mais recentemente, a utilização de bibliotecas genômicas construídas em cosmídeos como sonda tem possibilitado a identificação por FISH de genes cópia simples em cromossomos de espécies de peixes. Como exemplos, um fragmento do gene do hormônio do crescimento (GH2-D) foi situado nos cromossomos dos salmões *O. mykiss* e *O. kisutch* (Iturra *et al.*, 2001) e o gene da tirosina quinase neurotrófica foi localizado nos cromossomos do conhecido paulistinha (*zebrafish*), *Danio rerio* (Sola e Gornung, 2001). Muito ainda necessita ser feito quanto à detecção de genes de cópias únicas em peixes, e essa é sem dúvida uma das grandes perspectivas dos estudos de FISH nesses animais. A localização cromossômica desses genes será de grande importância no estabelecimento de grupos de ligação, base para a construção de mapas genéticos das espécies.

OUTRAS TECNOLOGIAS APLICADAS À LOCALIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA NOS CROMOSSOMOS

Embora a FISH tenha sido utilizada como procedimento clássico na localização de seqüências de DNA nos cromossomos dos peixes, outras tecnologias têm-se mostrado muito promissoras e já começam a ser aplicadas. Uma dessas metodologias, o Zoo-FISH, possibilita que a organização das seqüências de DNA isoladas de uma espécie seja investigada em outras espécies. Até o momento, os trabalhos envolvendo Zoo-FISH têm se relacionado principalmente ao mapeamento de seqüências repetitivas (genes ribossomais e DNAs satélite) nos cromossomos.

A investigação de diferenças entre genomas tem sido estudada em espécies de peixes por hibridização genômica comparativa (CGH). Essa metodologia possui ampla aplicação, permitindo que regiões cromossômicas exclusivas de um genoma

sejam distinguidas das de outro genoma. A CGH está relacionada às diferenças que existem no DNA entre dois genomas, e não requer conhecimento prévio da composição das seqüências. Por exemplo, a CGH apresenta-se como método universal para identificar cromossomos sexuais diferenciados sob o ponto de vista molecular. Traut e Winking (2001) estudaram os estágios da evolução cromossômica do sexo em peixes utilizando a CGH e identificaram segmentos cromossômicos particulares que eram sexo-específicos. A CGH também tem sido aplicada na identificação de híbridos entre espécies de salmonídeos (Fujiwara *et al.*, 1997) e mostra-se como ferramenta fabulosa para a investigação dos sistemas de cromossomos supernumerários que ocorrem com muita freqüência nos peixes neotropicais.

A localização simultânea de diferentes seqüências de DNA ou genes nos cromossomos mostra-se extremamente promissora, pois possibilita maior precisão no mapeamento dos cromossomos. Por intermédio dessa tecnologia, Jesus *et al.* (2003) mapearam duas famílias de DNAs satélite nos cromossomos do curimatá *P. lineatus*, e Almeida-Toledo *et al.* (2002) realizaram o mapeamento dos genes ribossomais 5S e 45S nos cromossomos de diferentes espécies de lambaris do gênero *Astyanax*.

Outra tecnologia que tem sido aplicada com muito sucesso nos peixes é o PRINS (*primed in situ labeling*), que consiste na identificação de seqüências específicas de DNA nos cromossomos, utilizando o procedimento-padrão de uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que é realizada na lâmina onde estão fixados os cromossomos. O fundamento da técnica está na utilização do DNA cromossômico como molde da reação de PCR e de iniciadores (*primers*) específicos das seqüências de interesse que se pretende localizar. O procedimento de PRINS já foi aplicado na identificação de genes ribossomais 5S no gênero *Leporinus* (Martins e Galetti, 1999) e de DNA satélite em *D. rerio* (Sola *et al.*, 1999). Particularmente em *Leporinus*, o PRINS mostrou-se muito eficiente, pois possibilitou a identificação de agrupamentos muito pequenos de DNAr 5S, de difícil visualização pela FISH convencional. O PRINS mostra-se bastante promissor na localização cromossômica de genes de cópia única ou de poucas cópias, uma vez que um grande número de ciclos de amplificação pode ser realizado, levando a um aumento no sinal produzido, facilitando sua visualização.

PERSPECTIVAS

A pintura cromossômica, amplamente difundida em mamíferos pela disponibilidade de sondas produzidas a partir dos cromossomos de algumas espécies, representa uma

tecnologia muito promissora a ser aplicada também a peixes, apresentando-se como ferramenta para os estudos de homologies cromossômicas, visto não ser possível obter bandas longitudinais estruturais nos cromossomos dos peixes.

Por meio de técnicas de microdissecção, um cromossomo ou parte dele pode ser isolado e dele serem construídas sondas utilizáveis na pintura cromossômica. Atualmente encontramos na literatura uma única referência à microdissecção cromossômica em peixes. Na busca por marcadores cromossômicos de sexo, Harvey *et al.* (2002) utilizaram microdissecção cromossômica para investigar os prováveis cromossomos sexuais da tilápia *O. niloticus*. Em análises de complexo sinaptonêmico realizadas por Foresti *et al.* (1993) foi sugerido que a tilápia possui um sistema XX/XY, representado pelo maior par cromossômico do complemento. Posteriormente, Harvey *et al.* (2002) obtiveram sondas por microdissecção dos prováveis cromossomos X e Y, e a hibridização dessas sondas aos cromossomos metafásicos mostrou a existência de diferenças nos cromossomos sexuais da espécie. Esses dados suportam a hipótese de que o primeiro par cromossômico da tilápia está relacionado à determinação sexual e sugere também que os cromossomos sexuais dessa espécie estão em estágio inicial de divergência.

Com a conclusão do seqüenciamento do genoma de espécies de peixes – genoma do paulistinha (*D. rerio*) e do baiacu japonês (*Fugu rubripes*), por exemplo – estarão disponíveis à comunidade científica bibliotecas genômicas contendo seqüências de todo o genoma dessas espécies que poderão ser utilizadas como sonda no mapeamento gênico, pintura cromossômica e Zoo-FISH.

Em geral, pouco se sabe sobre a organização genômica dos peixes. A grande característica que difere o genoma dos peixes do dos vertebrados de sangue quente é a compartimentalização genômica. As espécies de sangue quente apresentam o genoma organizado em mosaicos isocóricos, ou seja, segmentos de DNA caracterizados por uma composição de bases similares (Bernardi, 1992). Genes constitutivos e estruturais, por exemplo, encontram-se alocados em isocores específicos. Enquanto dadas famílias isocóricas são ricas em conteúdo GC, outras são pobres na presença dessas bases. Nos peixes, bem como nos anfíbios, o grau de compartimentalização composicional é menor, e acredita-se que esse fato *per si* seria o responsável pela ausência de bandas longitudinais (tipo G) em seus cromossomos (Bernardi, 1992).

Dessa forma, as tecnologias apresentadas neste capítulo, e ainda pouco aplicadas aos peixes, representam fontes promissoras no fornecimento de resultados que ajudem a esclarecer a organização estrutural do genoma desse importante grupo de vertebrados.

REFERÊNCIAS

- ABUÍN, M.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of the telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. *Genome*, v. 39, p. 1035-1038, 1996.
- AGUILAR, C. T. *Estudos citogenéticos e moleculares em populações brasileiras de Leporellus vittatus (Characiformes, Anostomidae)*. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet. Gen. Res.*, v. 97, p. 229-233, 2002.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; STOCKER, A. J.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, A. S. Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Chromosome Res.*, v. 4, p. 301-305, 1996.
- ATKIN, N. B.; OHNO, S. DNA values of four primitive chordates. *Chromosoma*, v. 23, p. 10-13, 1967.
- BERNARDI, G. The vertebrate genome: isochores and chromosomal bands. *Chromosomes Today*, v. 11, p. 49-60, 1992.
- BÓAN, F.; VIÑAS, A.; RODRIGUEZ, J. M.; SÁNCHEZ, L.; GÓMEZ-MÁRQUEZ, J. A new EcoRI family of satellite DNA in lampreys. *FEBs Letters*, v. 394, p. 187-190, 1996.
- BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR bearing X chromosome. *Chromosome Res.*, v. 8, p. 111-118, 2000.
- BRENNER, S.; ELGAR, G.; SANDFORD, R.; MACRAE, A.; VENKATESH, B.; APARICIO, S. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, v. 366, p. 265-268, 1993.
- BRUM, M. J. I.; GALETTI, Jr. P. M. Teleostei ground plan karyotype. *J. Comp. Biol.*, v. 2, p. 91-102, 1997.
- CAPRIGLIONE, T.; MORESCALCHI, A.; OLMO, E.; ROCCO, L.; STINGO, L.; MANZO, S. Satellite DNAs heterochromatin and sex chromosomes in *Chianodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). *Polar Biol.*, v. 14, p. 285-290, 1994.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 55, p. 139-150, 2002.
- CHEW, J. S. K.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; DOBSON, M. J. Molecular and cytogenetics analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, v. 111, p. 45-52, 2002.

CROLLIUS, H. R.; JAILLON, O.; DASILVA, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; FIZAMES, C.; FISCHER, C.; BOUNEAU, L.; BILLAULT, A.; QUETIER, F.; SAURIN, W.; BERNOT, A.; WEISSENBACH, J. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res.*, v. 10, p. 939-949, 2000.

DATTA, U.; DUTTA, P.; MANDAL, K. Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. *Gene*, v. 62, p. 331-336, 1988.

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

DENOVAN, E. M.; WRIGHT, J. M. A satellite DNA family from pollock (*Pollachius virens*). *Gene*, v. 87, p. 279-283, 1990.

DEVLIN, R. H.; McNEIL, B. K.; DONALDSON, E. M. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 48, p. 1606-1612, 1991.

DEVLIN, R. H.; STONE, G. W.; SMAILUS, D. E. Extensive direct-tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y chromosome of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Mol. Evol.*, v. 46, p. 277-287, 1998.

EKKER, M.; FRITZ, A.; WESTERFIELD, M. Identification of two families of satellite-like repetitive DNA sequences from the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics*, v. 13, p. 1169-1173, 1992.

ELGAR, G.; CLARK, M. S.; MEEK, S.; SMITH, S.; WARNER, S.; EDWARDS, Y. J. K.; BOUCHIREB, N.; COTTAGE, A.; YEO, G. S. H.; UMRANIA, Y.; WILLIAMS, G.; BRENNER, S. Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning. *Genome Res.*, v. 9, p. 960-971, 1999.

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

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

FONTANA, F.; TAGLIAVINI, J.; CONGIU, L. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica*, v. 111, p. 359-373, 2001.

FONTANA, F.; TAGLIAVINI, J.; CONGIU, L.; LANFREDI, M.; CHICCA, M.; LAURENTE, C.; ROSSI, R. Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Marine Biol.*, v. 132, p. 495-501, 1998.

FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CHICCA, M.; CONGIU, L.; TAGLIAVINI, J.; ROSSI, R. Fluorescent in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes, Acipenseriformes). *Genome*, v. 42, p. 1008-1012, 1999.

- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. Polymorphic nature of nucleolar organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 11, p. 137-144, 1981.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GALETTI Jr., P. M.; TOLEDO, L. F. A. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Genome*, v. 36, p. 1124-1128, 1993.
- FRANCK, J. P. C.; WRIGHT, J. M. Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiinae and haplochromine genome (Pisces: Cichlidae). *Genome*, v. 36, p. 187-194, 1993.
- FRANCK, J. P. C.; WRIGHT, J. M.; McANDREW, B. J. Genetic variability in a family of satellite DNAs from *Tilapia* (Pisces: Cichlidae). *Genome*, v. 35, p. 719-725, 1992.
- FREDEKSEN, S.; CAO, H.; LOMHOLT, B.; LEVAN, G.; HALLEMBERG, C. The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12→qter and the pseudogene repeat maps to 12q12. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 76, p. 101-106, 1997.
- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F.; MICHIIHIRO, C.; YOSHIDA, M. S. Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma.*, v. 106, p. 44-52, 1997.
- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F.; YOSHIDA, M. S. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res.*, v. 6, p. 463-471, 1998.
- GALETTI, Jr., P. M. *Estudos citogenéticos na família Anostomidae do rio Mogi-Guaçu, SP (Pisces-Teleostei)*. 1979. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- GALETTI, Jr., P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia*, v. 60, p. 375-382, 1995.
- GALETTI, Jr., P. M.; MESTRINER, C. A.; MONACO, P. J.; RASCH, E. M. Post-zygotic modifications and intra-and interindividual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome Res.*, v. 3, p. 285-290, 1995.
- GALETTI, Jr., P. M.; RASCH, E. M. Chromosome studies in *Poecilia lacpunctata* with NOR polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei, Poeciliidae). *Ichth. Explor. Freshwater.*, v. 4, p. 269-277, 1993.
- GARRIDO-RAMOS, M. A.; JAMILINA, M.; LOZANO, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ RÉJON, M. Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 65, p. 233-237, 1994.
- GARRIDO-RAMOS, M. A.; SORIGUER, M. C.; HÉRRAN, R. M.; JAMILINA, C.; RUIZ REJÓN, A.; DOMEZAIN, J.; HERNANDO, A.; RUIZ REJÓN, M. Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Mar. Biol.*, v. 129, p. 33-39, 1997.
- GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRÁN, R.; RÉJON, C. R.; REJÓN, M. R. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 83, p. 3-9, 1998.

- GOODIER, J. L.; DAVIDSON, W. S. Characterization of a repetitive element detected by *NheI* in the genomes of *Salmo* species. *Genome*, v. 37, p. 639-645, 1994.
- HAAF, T.; SCHMID, M. An early stage of ZZ/ZW sex chromosome differentiation in *Poecilia shenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma*, v. 89, p. 37-41, 1984.
- HAAF, T.; SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; GALETTI Jr., P. M.; WILLARD, H. F. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Res.*, v. 1, p. 77-86, 1993.
- HALLENBERG, C.; NEDERBY-NIELSEN, J.; FREDERIKSEN, S. Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene*, v. 142, p. 291-295, 1994.
- HART, R. P.; FOLK, W. R. Structure and organization of a mammalian 5S gene cluster. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 11706-11711, 1982.
- HARTLEY, S. E.; DAVIDSON, W. S. Characterization and distribution of genomic repeat sequences from Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). In: *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, 1994. p. 271-280.
- HARVEY, S. C.; MASABANDA, J.; CARRASCO, L. A. P.; BROMAGE, N. R.; PENMAN, D. J.; GRIFFIN, D. K.; Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. *Cytogenet. Gen. Res.*, v. 97, p. 76-80, 2002.
- HATANAKA, T. *Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe Prochilodus marggravii (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco*. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P. M. A polymorphic telomeric-like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet. Gen. Res.*, v. 98, p. 76-78, 2002.
- HE, L.; AHU, A.; FARAS, A. J.; GUISE, K. S.; HACKETT, P. B.; KAPUSCINISKI, A. R. Characterization of *AluI* repeats of zebrafish (*Brachidanio rerio*). *Mol Marine Biol Biotech.*, v. 1, p. 125-135, 1992.
- HUANG, C.; HUANG, F.; WANG, Y.; HSIAO, P.; LO, T. Molecular cloning and relationship of highly repetitive *HindIII* sequence in three cyprinid species: silver carp, bighead carp and grass carp. *Life Sciences*, v. 17, p. 85-90, 1993.
- INAFUKU, J.; NABEYAMA, M.; KIKUMA, Y.; SAITOH, J.; KIBOTA, S.; KOHNO, S. Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). *Chromosome Res.*, v. 8, p. 193-199, 2000.
- ITURRA, P.; LAM, N.; FUENTE, M.; VERGARA, N.; MEDRANO, J. F. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica*, v. 111, p. 125-131, 2001.
- JESUS, C. M.; GALETTI Jr., P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, v. 118, p. 25-32, 2003.

- KIKUMA, Y.; INAFUKU, J.; KUBOTA, S.; KOHNO, S. Banding karyotype and 5S ribosomal DNA loci in the Japanese bitterling, *Rhodeus ocellatus* (Cyprinidae). *Chromosome Sci.*, v. 3, p. 101-103, 2000.
- KOMIYA, H.; HASEGAWA, M.; TAKEMURA, S. Differentiation of oocyte- and somatic-type 5S rRNAs in animals. *J. Biochem.*, v. 100, p. 369-374, 1986.
- KOEHLER, M. R.; DEHM, D.; GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; HAAF, T.; MOLINA, W. F.; GALETTI Jr., P. M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chromosome Res.*, v. 5, p. 12-22, 1997.
- KUBOTA, S.; KURO-O, M.; MIZUNO, S.; KOHNO, S. Germ line-restricted highly repeated DNA sequences and their chromosome localization in a Japanese hagfish (*Eptatretus okinoseanus*). *Chromosoma*, v. 102, p. 163-173, 1993.
- KUBOTA, S.; TAKANO, J.; TSUNEISHI, R.; KOBAYAKAWA, S.; FUJIKAWA, N.; NABEYAMA, M.; KOHNO, S. Highly repetitive DNA families restricted to germ cells in a Japanese hagfish (*Eptatretus burgeri*): a hierarchical and mosaic structure in eliminated chromosomes. *Genetica*, v. 111, p. 319-328, 2001.
- LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRRÁN, R.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; RUIZ REJÓN, M.; FONTANA, F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Res.*, v. 9, p. 47-52, 2001.
- LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome*, v. 36, p. 762-773, 1993.
- MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G. C. Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, v. 111, p. 433-438, 2001.
- MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G. C.; MACHELLA, N.; CAPUTO, V. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica*, v. 110, p. 73-78, 2001.
- MANDRIOLI, M.; COLOMBA, M. S.; VITTURI, R. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae). *Genetica*, v. 108, p. 191-195, 2000.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, v. 109, p. 161-168, 2000.
- MANTOVANI, M. *Citogenética comparativa entre populações de Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da bacia do rio Paranaapanema. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MARTÍNEZ, J. L.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; PENDÁS, A. M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet Cell Genet.*, v. 73, p. 149-152, 1996.

- MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay river basin. *Genet. Mol. Biol.*, v. 21, p. 355-360, 1998.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.*, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Res.*, v. 8, p. 353-355, 2000.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. 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, 2001a.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes?. *Genetica*, v. 111, p. 439-446, 2001b.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas*, v. 133, p. 39-46, 2000.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WRIGHT, J. M.; FORESTI, F. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Gen. Res.*, v. 98, p. 78-85, 2002.
- MESTRINER, C. A.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr, P. M. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): Analysis of a sex system. *Chromosome Res.*, v. 3, p. 440-443, 1995.
- MESTRINER, C. A.; GALETTI Jr, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, v. 85, p. 1-9, 2000.
- MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD, O. G.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L.; MOYZIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, v. 99, p. 3-10, 1990.
- MILLER, E. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic hybrid cells. *Expl. Cell. Res.*, v. 101, p. 235-243, 1976.
- MOLINA, W. F.; GALETTI Jr, P. M. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet. Mol. Biol.*, v. 25, p. 373-377, 2002.
- MONACO, P. J.; SWAN, K. F.; RASCH, E. M.; MUSICH, P. R. Characterization of a repetitive DNA in the unisexual fish *Poecilia formosa*. I. Isolation and cloning of the *MboI* family. *Evol. Ecol. Unisex Vertebrates*, v. 466, p. 123-131, 1989.

- MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J. L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A. M. Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet.*, v. 75, p. 145-150, 1996.
- MOYER, S. P.; MA, D. P.; THOMAS, T. L.; GOLD, J. R. Characterization of a highly repeated satellite DNA from the cyprinidae fish *Notropis lutrensis*. *Comp Biochem Physiol.*, v. 91B, p. 639-646, 1988.
- MURAKAMI, M.; FUJITANI, H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes Genet. Syst.*, v. 73, p. 9-20, 1998.
- MURAMOTO, J. I.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma*, v. 24, p. 59-66, 1968.
- NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, v. 103, p. 31-39, 1994.
- NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M.; SCHRODER, J. H.; ZISCHLER, H.; EPPLER, J. T. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J. Mol. Evol.*, v. 30, p. 456-462, 1990.
- NANDA, I.; SCHARTL, M.; FEICHTINGER, W.; EPPLER, J. T.; SCHMID, M. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analyzed by simple repetitive DNA sequence. *Chromosoma*, v. 101, p. 301-310, 1992.
- NETTO, M. R. C. B. *Caracterização citogenética e molecular de duas espécies do gênero Centropomus (Teleostei, Perciformes)*. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- NIEDDU, M.; PICHIRI, G.; CONI, P.; SALVADORI, S.; DEIANA, A. M.; MEZZANOTTE, R. A comparative analysis of European and American eel (*Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata*) genomic DNA: 5S rDNA polymorphism permits the distinction between the two populations. *Genome*, v. 41, p. 728-732, 1998.
- OHNO, S. The enormous diversity in genome size of fishes as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, v. 99, p. 120-130, 1970.
- OHNO, S. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In: JOHN, B. (Ed.). *Animal Cytogenetics*, Gebrüder Borntraeger, 1974. 92 p.
- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res.*, v. 6, p. 205-211, 1998.
- OLIVEIRA, C.; CHEW, J. S. K.; PORTO-FORESTI, F.; DOBSON, M.; WRIGHT, J. M. A LINE2 repetitive element from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: Sequence analysis and chromosomal distribution. *Chromosoma*, v. 108, p. 457-468, 1999.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, 8., 2000, Manaus. *Anais...* Manaus, Brasil, 2000.

- OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; FORESTI, F. Chromosome structure in fishes. In: Some aspects of chromosome structure and function. New Delhi, India, 103-108 pp. 2002.
- OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; THAERON, C.; HUREAU, J. C. Antarctic fish chromosome banding: significance for evolutionary studies. *Cybiu*m, v. 21, p. 399-409, 1997.
- PADHI, B. K.; GHOSH, S. K.; MANDAL, R. K. Characterization of *Mbo*I satellites in *Cirrhina mrigala* and *Clarias batrachus* (Pisces). *Genome*, v. 41, p. 34-39, 1998.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Evidence for a system of supernumerary chromosome in *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia*, v. 36, p. 307-314, 1983.
- PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 67, p. 31-36, 1994a.
- PENDAS, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VASQUEZ, E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*, v. 103, p. 147-152, 1994b.
- PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. Localization of repetitive DNAs to zebrafish (*Danio rerio*) chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.*, v. 8, p. 27-35, 2000.
- REED, K. M.; PHILLIPS, R. B. Molecular cytogenetic analysis of the couple-CMA3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 70, p. 104-107, 1995a.
- REED, K. M.; PHILLIPS, R. B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma*, v. 104, p. 242-251, 1995b.
- SAJDAK, S. L.; REED, K. M.; PHILLIPS, R. B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J. Mol. Evol.*, v. 46, p. 680-688, 1998.
- SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma*, v. 95, p. 271-284, 1987.
- SOLA, L.; GABRIELLI, I.; INNOCENTIIS, S.; GORNUNG, E. Chromosomal localization of zebrafish AluI repeats by primed *in situ* (PRINS) labeling. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 84, p. 28-30, 1999.
- SOLA, L.; INNOCENTIIS, S.; GORNUNG, E.; PAPALIA, S.; ROSSI, A. R.; MARINO, G.; MARCO, P.; CATAUDELLA, S. Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Marine Biol.*, v. 137, p. 47-51, 2000.
- SOLA, L.; GORNUNG, E. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica*, v. 111, p. 397-412, 2001.
- SOUZA, I. L.; GALIÁN, J.; RUA, P.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia*, v. 66, p. 85-91, 2001.

STEIN, J.; PHILLIPS, R. B.; DEVLIN, R. H. Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet.*, v. 92, p. 108-110, 2001.

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

TAGLIAVINI, J.; WILLIOT, P.; CONGIU, L.; CHICCA, M.; LANFREDI, M.; ROSSI, R.; FONTANA, F. Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. *Heredity*, v. 83, p. 520-525, 1999.

TRAUT, W.; WINKING, H. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosome Res.*, v. 9, p. 659-672, 2001.

TURNER, B. J.; ELDER, J. F.; LAUGHLIN, T. F. Repetitive DNA sequences and the divergence of fish populations: some hopeful beginnings. *J. Fish. Biol.*, v. 39, p. 131-142, 1991.

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

VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 54, p. 365-369, 2001.

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

WRIGHT, J. M. Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucl. Acid. Res.*, v. 17, p. 5071-5079, 1989.

ZIJLSTRA, C.; MELLINK, C. H. M.; HAAN, N. A.; BOSMA, A. A. Localization of the 18S, 5.8S and 28S rRNA genes and the 5S rRNA genes in the babirusa and the white-lipped peccary. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 77, p. 273-277, 1997.