

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS BOTUCATU**  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Isolamento e caracterização de marcadores de DNA associados ao sexo e  
de segmentos de DNA repetitivo em espécies do gênero *Brycon*  
(Characidae, Bryconinae)**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências, Campus de  
Botucatu, UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre, pelo Programa de Pós  
Graduação em Ciências Biológicas/AC:  
Genética.

Mestrando: Eder Marques da Silva  
Orientadora: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko  
Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Martins

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me fortalece e me conduz na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Odilon e Vilma, pelo amor, carinho, exemplo de vida e por me ensinarem a vencer as dificuldades para alcançar meus objetivos, sem nunca passar por cima de ninguém, apenas por cima dos problemas de maneira digna e honrada.

A meus irmãos e meus sobrinhos por sua presença em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko, pela oportunidade de realizar pós-graduação, orientando durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cesar Martins, pela co-orientação, e por me permitir frequentar seu laboratório, pois isso foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao senhor Sílvio Albano Moreira Campos, por seu conselho e apoio, que foram fundamentais para que eu adquirisse confiança e pudesse iniciar minha vida profissional; um “avô” (com todo o respeito) que eu nunca pude ter.

Ao professor Luiz Eduardo Aparecido Grassi e sua esposa, professora Maria de Fátima Mattos Grassi (Fatinha), minha segunda família, pessoas que eu tive a honra e o privilégio de conviver durante um período muito decisivo de minha vida, por serem ótimos exemplos de caráter e dedicação.

A meu ex-professor de biologia do cursinho Rogério Madeira, que me fez enxergar através de sua competência um caminho profissional para seguir.

Aos grandes amigos Renato e Juan, pelo apoio desde quando cheguei a Botucatu, e por serem pessoas muito dignas de confiança; sei que posso contar com eles sempre.

Às minhas amigas de laboratório, Jéssica, Valquíria e Bianca, pelo grande apoio durante o tempo no qual convivemos, pois tenho certeza que estão sempre torcendo por mim.

Aos amigos do laboratório “LGI”, Guilherme (kbelo), Diogo, Juliana, Bruno, Rafael, Marcos e Danillo, por todo o apoio durante o mestrado.

Ao técnico de laboratório do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, José Eduardo (Zé), ótimo profissional e pessoa fantástica.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biociências da UNESP, por permitir o uso de seus aparelhos.

A Elaine, faxineira do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, sempre trabalhando contente, e tendo paciência durante a limpeza do laboratório.

Aos amigos da Liga do Chop, Piruca, Treko, Gordinho, Boffe, Ranchera, Bera, Pé, Pepe, Loba, Grão, Arena e Vanda, que trabalharam comigo de madrugada, no período no qual eu ainda não tinha bolsa. São pessoas maravilhosas e estão sempre de bem com a vida e trabalhando muito duro, e sempre me apoiaram.

Aos amigos de infância, João Paulo Yamaguchi e Bruno Bezerra, pois sei que mesmo eles estando longe, torcem pelo meu sucesso todos os dias.

A colega Arina, pela ajuda na qualificação das imagens.

Ao pessoal do Cepta/IBAMA de Pirassununga, por cederem os animais utilizados nesse trabalho.

A CAPES, por conceder a Bolsa de estudos durante boa parte da realização desse trabalho.

Aos amigos Tobias, Fernando, Luciana (Lú), Alessandra Paim, Sílvio César (ex-amigo de república) e Luana, ótimas pessoas; sei que também sempre estão torcendo pelo meu sucesso.

Ao amigo Caio, também pelo apoio quando cheguei a Botucatu.

A colega Marcela (Scargot), por me ceder seu antigo computador.

Enfim, a todas as pessoas que estão presentes, ou estiveram presentes, em minha vida e que torcem por minhas conquistas.

**MUITO OBRIGADO!**

## LISTA DE FIGURAS:

### Introdução e Materiais e Métodos

Figura 1: Representação esquemática da metodologia de RAPD .....	11
Figura 2: Representação esquemática da metodologia de digestão enzimática .....	15
Figura 3: Exemplar de <i>Brycon cephalus</i> (matrinchã da Amazônia). .....	18
Figura 4: Exemplar de <i>Brycon orbignyana</i> (piracanjuba). .....	19

### Capítulo 1

Figura 1: Padrões de RAPD de <i>Brycon cephalus</i> com o primer OPP-15 .....	57
Figura 2: Sequências nucleotídicas consenso de dois fragmentos de DNA isolados de fêmeas de <i>Brycon cephalus</i> .....	58
Figura 3: “Dot blotting” de DNA total de <i>Brycon cephalus</i> .....	59
Figura 4: Marcador SCAR associado a fragmento de DNA isolado de fêmeas de <i>Brycon cephalus</i> .....	60

### Capítulo 2

Figura 1: Restrição enzimática em amostras de DNA de espécies do gênero <i>Brycon</i> .....	70
Figura 2: Sequência nucleotídica consenso de um fragmento de DNA isolado de <i>Brycon cephalus</i> com a enzima <i>EcoRV</i> .....	71
Figura 3: Cromossomos metafásicos de <i>Brycon cephalus</i> e <i>B. orbignyana</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS:

### Introdução e Materiais e Métodos

Tabela 1: Principais marcadores moleculares utilizados atualmente..... 10

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados como primers em RAPD-PCR..... 24

### Capítulo 1

Tabela 1: Potenciais fragmentos sexo-específicos identificados em *Brycon  
cephalus*..... 56

## RESUMO

Bryconinae compreende um grupo de peixes com um grande número de espécies distribuídas em sistemas hidrográficos da América Central e da América do Sul. Análises cromossômicas baseadas em técnicas citogenéticas clássicas revelaram que todas as espécies estudadas até o momento apresentam cariótipos similares sem a presença de cromossomos sexuais heteromórficos. Visando ampliar os dados genéticos acerca das relações entre as espécies deste gênero e sobre a evolução cromossômica deste grupo, o objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar fragmentos de DNA associados a um determinado sexo e repetições de DNA satélite em *Brycon cephalus* e *B. orbignyanus*. Desta forma, uma análise de marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e uma dinâmica de digestão enzimática de DNA total foram realizadas. Sessenta e seis primers decâmeros foram utilizados em PCR revelando um fragmento de RAPD, composto por 535 pb, presente em fêmeas de *B. cephalus*. Dados de hibridização em membrana ("dot-blot") e de um marcador SCAR ("Sequence Characterized Amplified Region") desenvolvido confirmaram a especificidade deste fragmento a fêmeas desta espécie e revelaram sua ausência em duas outras espécies do gênero - *B. orbignyanus* e *B. lundii*. Digestões enzimáticas de DNA de *B. cephalus* e *B. orbignyanus* não evidenciaram diferenças entre machos e fêmeas. Por outro lado, as digestões realizadas com *EcoRV*, *EcoRI*, *NotI*, *XbaI* e *XhoI* em *B. cephalus* levaram à identificação de fragmentos de aproximadamente 250-300 pb em ambos os sexos que provavelmente correspondem a repetições de DNA satélite, denominadas de SatBc1, SatBc2, SatBc3, SatBc4 e SatBc5, respectivamente. A enzima *HindIII* permitiu a visualização de duas bandas de restrição com cerca de 650 e 850 pb (denominadas de SatBo1 e SatBo2) em machos e fêmeas de *B. orbignyanus*. A caracterização do fragmento SatBc1 isolado de *B. cephalus* mostrou que sua unidade monomérica é constituída por 255 pb, sendo 52,9% AT-rica. Os dados de RAPD obtidos podem levar à suposição de que *B. cephalus* apresenta cromossomos sexuais heteromórficos que devem estar em uma fase inicial de diferenciação. As análises de digestão enzimática em *B. cephalus* e *B. orbignyanus* apontaram para a presença de distintas famílias de DNA satélite nos genomas das espécies do gênero *Brycon*. A ocorrência de distintos marcadores sexuais e de distintos segmentos de DNA repetitivo em espécies do gênero *Brycon* pode ser relacionada à natureza dinâmica da evolução molecular de tais marcadores, levando ao acúmulo e fixação de diferenças entre as espécies.

## ABSTRACT

Bryconinae stands for a fish group with several species that have been reported in South and Central America hydrographic systems. Chromosome analyses based on classical cytogenetic techniques have revealed that all species so far studied present similar karyotypes with no heteromorphic sex chromosomes. In order to improve genetic data on the species relationships and chromosome evolution, the purpose of the present study was to isolate and characterize sex-associated DNA fragments and satellite repeats in *Brycon cephalus* and *B. orbignyanus*. For this purpose, a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and a genomic DNA restriction digestion analysis were performed. Sixty six decamer primers were used in PCR revealing a RAPD fragment, composed by 535 bp, present in females of *B. cephalus*. Data on dot-blot hybridization and on a designed SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker confirmed its female-specificity in this species and revealed its absence in two other species of the genus - *B. orbignyanus* and *B. lundii*. Genomic DNA restriction digestions in *B. cephalus* and *B. orbignyanus* resulted in no differences between sexes of both species. However, *EcoRV*, *EcoRI*, *NotI*, *XbaI* and *XhoI* DNA digestions in *B. cephalus* led to the identification of fragments of approximately 250-300 bp in both sexes that probably correspond to satellite DNA repeats, denominated SatBc1, SatBc2, SatBc3, SatBc4 and SatBc5, respectively. The *HindIII* enzyme permitted the visualization of two restriction bands of around 650 and 850 bp (named as SatBo1 and SatBo2) in males and females of *B. orbignyanus*. Characterization of the SatBc1 fragment isolated from *B. cephalus* indicated that its monomeric unit is constituted by 255 bp and 52.9% AT rich. The obtained RAPD data can lead to the supposition that *B. cephalus* may present heteromorphic sex chromosomes that should be in an early phase of differentiation. Restrictions digestion analyses in *B. cephalus* and *B. orbignyanus* point to the presence of different DNA satellite families in the genomes of *Brycon* species. The occurrence of diverse sexual markers and diverse repetitive DNA segments in different species of the genus *Brycon* can be related to the dynamic nature of the molecular evolution of such markers, leading to the accumulation and establishment of differences among species.

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 A subfamília Bryconinae .....	01
1.2 Aspectos gerais do gênero <i>Brycon</i> .....	03
1.3 Marcadores genéticos moleculares .....	08
1.3.1 RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).....	10
1.3.2 DNA satélite.....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Materiais .....	18
3.2 Métodos.....	19
3.2.1 Extração e quantificação de DNA .....	19
3.2.2 Digestão enzimática de DNA total .....	22
3.2.3 RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).....	23
3.2.4 Purificação de fragmentos de DNA de interesse de gel de agarose.....	26
3.2.5 Clonagem de fragmentos de DNA.....	27
3.2.5.1 Ligação inserto-plasmídeo .....	27
3.2.5.2 Transforma�o de bactérias competentes.....	28
3.2.5.3 Identifica�o de plasmídeos recombinantes .....	29
3.2.5.4 Mini-prepara�o para obten�o de plasmídeos recombinantes.....	30
3.2.6 Seqüenciamento nucleotídico.....	31



3.2.7	Análise das seqüências nucleotídicas.....	32
3.2.8	Hibridação em membrana.....	33
3.2.9	Desenvolvimento de marcadores SCAR ( “Sequence Characterized Amplified Region”). .....	34
3.2.10	Obtenção de cromossomos mitóticos .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1	CAPÍTULO 1: Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinchã, <i>Brycon cephalus</i> (Teleostei: Characiformes: Characidae).....	39
4.2	CAPÍTULO 2: Isolation and characterization of satellite DNA repeats in species of the genus <i>Brycon</i> (Characiformes: Characidae) .....	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A subfamília Bryconinae

Os peixes compreendem o maior grupo de vertebrados, com mais de 32.000 espécies reconhecidas, sendo que cerca da metade destas espécies são encontradas em água doce (Eschmeyer *et al.* 2010). A ordem Characiformes representa um dos maiores grupos de peixes de água doce, com pelo menos 1.953 espécies válidas (Nelson 2006; Eschmeyer & Fong 2010). A família Characidae, na qual se inclui a subfamília Bryconinae, é a maior e a mais complexa dentre as famílias da ordem Characiformes, englobando a maior parte dos peixes de água doce do Brasil (Britski 1972; Britski *et al.* 1988; Nelson 1994; Eschmeyer & Fong 2010). Embora o número e formas de caracídeos ainda não sejam exatamente determinados, pode-se considerar a ocorrência de cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros neste grupo, somente na América do Sul (Mirande 2010).

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

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Dentre as subfamílias de Characidae, Bryconinae destaca-se como um grupo de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na América do Sul e América Central - de Honduras até a Argentina (Géry & Mahnert 1992) - e, do ponto de vista taxonômico, Britski *et al.* (1988) consideram que seja constituída por um único gênero - *Brycon* Müller & Troschel 1844. Entretanto, esta disposição não é unânime, já que o próprio gênero é mal definido e reconhecido por uma combinação de caracteres pouco consistentes, alguns destes também compartilhados por outros Characidae neotropicais, como *Triportheus*, *Chalceus* e *Salminus* (Weitzman 1960). A provável natureza monofilética do grupo também é questionada, devido à grande diversidade de morfologia cranial e de dentes entre as diversas espécies de *Brycon* (Howes 1982; Castro & Vari 1990).

Considerando a proposição de que a subfamília Bryconinae seja composta não somente pelo gênero *Brycon*, Weitzman (1960) agrupa *Brycon*, *Triportheus* e *Chalceus* em uma única tribo, Bryconini, devido a algumas similaridades que apresentam em relação à forma e à distribuição dos dentes. Géry (1977), apesar de concordar com Weitzman (1960), subdivide a subfamília Bryconinae em três tribos: Bryconini, Salminini e Triportheini. Por outro lado, Uj (1990) eleva a subfamília Bryconinae ao nível de família, ou seja, Bryconidae, e mantém incluído nesta o gênero *Triportheus*. Portugal (1990) relaciona o gênero *Triportheus* a um grande grupo de caracídeos sul-americanos no qual estariam incluídos também *Brycon* e *Salminus*.

Um estudo filogenético mais recente, realizado pela análise de uma série de caracteres morfológicos, demonstrou a ocorrência de sete sinapomorfias em

diversas espécies do gênero *Brycon*, confirmando o monofiletismo do grupo (Zanata 2000). Entretanto, hipóteses prévias de que existe uma relação de parentesco próxima entre *Brycon* e os gêneros *Chalceus* e *Salminus* não foram corroboradas (Zanata 2000). Dados genéticos, obtidos através da análise de diferentes marcadores de DNA mitocondrial, também apontam para uma natureza monofilética para o grupo (Hilsdorf *et al.* 2008; Antunes *et al.* 2010).

Atualmente, considera-se que a subfamília Bryconinae englobe 43 espécies válidas, sendo 41 pertencentes ao gênero *Brycon*, uma ao gênero *Henochilus* e uma ao gênero *Chilobrycon* (Lima 2003).

## **1.2 Aspectos gerais do gênero *Brycon***

O gênero *Brycon* compreende um grupo de espécies de ampla distribuição na América do Sul e Central (Lima 2003), comumente conhecidas como matrinhãs, piracanjubas, pirapitingas, piraputangas e piabanhas. No Brasil, essas espécies encontram-se nas principais bacias hidrográficas. Assim, em cada região brasileira pode ser encontrada uma espécie endêmica de *Brycon* com grande potencial de ser produzida em cativeiro, prática que deve ser realizada com os devidos cuidados, pois seu translocamento pode se tornar um fator de risco para biodiversidade de cada região brasileira (Maria 2008). As espécies deste grupo são reofílicas, habitando rios de águas limpas e de alta oxigenação, onívoras e de médio e grande porte, podendo atingir até cerca de 8 Kg. Alimentam-se preferencialmente de insetos e vegetais, principalmente frutos e sementes

(Goulding 1980; Britski *et al.* 1988), além de larvas de outros peixes (Faria 1994; Belmont 1994).

Várias espécies do gênero *Brycon* apresentam grande importância para a pesca extrativista na região norte do Brasil, embora o mesmo não ocorra com espécies encontradas em outras regiões do país (Mendonça & Melo 1994). Dentre os Characiformes apontados como de grande potencial para piscicultura nacional, os peixes do gênero *Brycon* são incluídos como uns dos mais promissores (Woynarovich & Horváth 1983; Castagnolli 1992; Pereira Filho 1994), devido às suas qualidades quanto ao rápido crescimento e ganho de peso, adaptação para alimentação com ração artificial, excelente qualidade de carne e boa aceitação entre os consumidores (Saint-Paul & Werder 1977; Graef *et al.* 1986, 1987; Santamaria & Antunes 1999). Apesar de algumas dificuldades ainda encontradas com relação à capacidade de adaptação e manutenção em tanques, tais como sensibilidade destes animais ao processo de domesticação e manuseio e alta taxa de canibalismo na fase larval (Ceccarelli & Senhorini 1996), algumas espécies têm sido rotineiramente criadas com sucesso em cativeiro, como *Brycon cephalus* (Zaniboni 1985; Pereira Filho 1994), *Brycon* cf. *erithropterus* (Eckmann 1984), *Brycon lundii* (Woynarovich & Sato 1990), *Brycon insignis* (Faria 1994) e *Brycon orbignyianus* (Belmont 1994; Mendonça 1994).

Embora as espécies do gênero *Brycon* apresentem reconhecida importância comercial, atualmente encontram-se ameaçadas de extinção, na região da bacia do São Francisco, *Brycon lundii* (Godoy 1975; Braga 1982), na região da bacia do Paraná, *Brycon orbignyianus* (Azevedo 1972; Godoy 1975;

Mendonça & Melo 1994; Conte *et al.* 1995) e, na região da bacia do rio Paraíba do Sul, *Brycon insignis* (Narahara *et al.* 1994). De acordo com Agostinho *et al.* (2000), *Brycon orbignyianus* representava, antes da formação do reservatório da hidroelétrica de Itaipu em 1977, a sétima espécie de peixe de maior abundância na bacia do Paraná e, em levantamentos posteriores (anos de 1987 e 1997), já não aparecia mais na pesca artesanal. Schubart (1963, *In* Godoy 1975) também observou que o número de exemplares desta espécie nativa da bacia do Paraná, capturados no rio Mogi-Guaçu, diminuiu cerca de 80% em 21 anos, entre 1942 e 1963. Portanto, já naquela época, podia-se prever seu desaparecimento. No ano de 1978, não foram mais encontrados exemplares de *B. orbignyianus* no rio Mogi-Guaçu (Ceccarelli & Senhorini 1996). Situação similar também foi observada na bacia do Paranapanema, não tendo sido observados exemplares da espécie após o ano de 1999 (Vermuln Jr. *et al.* 2002 a, b).

A grande preocupação com relação ao desaparecimento das espécies do gênero *Brycon* na natureza pode ser comprovada pela inclusão de *B. devillei*, *B. insignis*, *B. nattereri*, *B. opalinus*, *B. orbignyianus* e *B. vermelha* na Lista Oficial de Fauna Ameaçada de Extinção publicada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Outras espécies do gênero, como *B. lundii*, *B. bahiensis* e *B. erythrura* encontram-se em listas regionais/estaduais de espécies de peixes ameaçadas no Brasil (Rosa & Menezes 1996; Lins *et al.* 1997, Machado 1998; Fontana *et al.* 2002). Além disso, a espécie *B. orthotaenia* encontra-se classificada como “vulnerável” e outras duas espécies

do gênero - *B. amazonicus* e *B. polylepis* - foram designadas como “least concern” junto ao IUCN (International Union for Conservation of Nature).

A diminuição do tamanho populacional e/ou extinção destas espécies deve-se principalmente a intervenções humanas, como o assoreamento de rios, a crescente poluição e a implantação de usinas hidroelétricas. A construção de barragens hidroelétricas, entre outras alterações, torna o ambiente mais lântico, sem corredeiras, além de alagar as matas ciliares pré-existentes, uma das principais fontes de alimento destes animais (Faria 1994). Devido ao fato das espécies do gênero serem muito apreciadas na pesca esportiva, a captura intensiva predatória também é uma causa importante de seu declínio (Lopera-Barrero 2007). Tundisi (2003) relatou outros fatores que podem ameaçar a biodiversidade aquática, como por exemplo, o tratamento inadequado da água e dos esgotos nas grandes cidades, a agricultura, indústrias, irrigação, aquicultura e pecuária intensiva.

Espécies do gênero *Brycon* também possuem uma interessante importância do ponto de vista biológico, pois atuam como biocontroladores e biodispersores. *Brycon guatemalensis* foi identificada como um agente biológico no controle de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue (Martinez-Ibarra *et al.* 2002), e também foi considerada como um dispersor de sementes de *Ficus insipida* (Horn 1997; Banack *et al.* 2002).

Apesar do grande potencial econômico e biológico de *Brycon* e do declínio acentuado de populações naturais de algumas espécies do grupo, ainda existem poucos estudos relativos à sua propagação artificial e à sua conservação biológica.

Estes têm sido direcionados principalmente a análises de estocagem (Sallum 1988; Honczaryk 1994; Mendonça 1994; Melo & Pereira 1999; Gomes *et al.* 2000), reprodução induzida (Eckmann 1984; Bernardino *et al.* 1993; Romagosa *et al.* 1994; Belmont 1994; Faria 1994; Sato *et al.* 1997; Andrade-Talmelli *et al.* 2002; Narahara *et al.* 2002), alimentação e nutrição (Borghetti *et al.* 1991; Mendonça 1994; Pezzato *et al.* 1994; Fosse 1998; Ceccarelli & Volpato 2001; Moreira *et al.* 2001; Frasca-Scorvo *et al.* 2001; Borba *et al.* 2003). Dados relativos à fisiologia destes animais são também escassos, já que poucas espécies têm sido estudadas (Driedzic *et al.* 1996; Seixas *et al.* 1999; Wilson *et al.* 1999; de Seixas *et al.* 2000; Leitão *et al.* 2000; Seixas *et al.* 2001; Carneiro & Urbinati 2001; Urbinati & Carneiro 2001; Figueiredo-Garutti *et al.* 2002).

As pesquisas citogenéticas representam a maior parte dos dados genéticos existentes sobre o gênero *Brycon*. São conhecidos os complementos cariotípicos de *B. lundii*, *B. brevicauda*, *B. microlepis*, *B. cephalus*, *Brycon* sp. do Rio Araguaia-MT, *B. orbignyianus* (Margarido & Galetti 1996), *B. insignis* (Margarido & Galetti 1996; Almeida-Toledo *et al.* 1996), *B. reinhardti*, *B. cf. cephalus* (Almeida-Toledo *et al.* 1996), *B. cf. erythropterum* (Santos *et al.* 1985), *B. cf. pesu* (Porto *et al.* 1992) e *B. henni* (Lopez *et al.* 2008). Todas as espécies do gênero analisadas apresentam um número diplóide de 50 cromossomos, indicando que o grupo é caracterizado por uma grande estabilidade cariotípica em nível numérico. As análises citogenéticas realizadas em *Brycon* incluem também a descrição do padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (bandas C) e de regiões organizadoras de nucléolos (RONs), através de coloração com nitrato de prata (Margarido &



Galetti 1996; Almeida-Toledo *et al.* 1996). Além disso, análises utilizando fluorocromos GC-específicos (Margarido & Galetti 1996, 1999) e hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAs ribossômicos (DNAr) 18S (Wasko & Galetti 2000) e 5S (Wasko *et al.* 2001) também já foram realizadas para algumas espécies do gênero.

Análises genéticas em espécies do gênero *Brycon* envolvendo a utilização de marcadores moleculares, embora ainda reduzidas, incluem dados direcionados à avaliação de diversidade genética de estoques naturais e cultivados (Wasko & Galetti 2002; Hilsdorf *et al.* 2002; Wasko & Galetti 2003; Wasko *et al.* 2004; Barroso *et al.* 2005; Barrero *et al.* 2006; Santis *et al.* 2007; Lopera *et al.* 2008; Matsumoto & Hilsdorf 2009; Lopera-Barrero *et al.* 2010; Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2010) e a inferências filogenéticas (Calcagnotto *et al.* 2005; Hilsdorf *et al.* 2008; Antunes *et al.* 2010; Abe 2011).

### **1.3 Marcadores genéticos moleculares**

Estudos envolvendo marcadores moleculares tiveram seu início na década de 1960, quando Harris (1966) e Lewontin & Hubby (1966) descreveram, independentemente, a técnica de eletroforese de proteínas para análise de diferentes isoformas de uma mesma proteína, denominadas alozimas. Posteriormente, com o avanço das metodologias da área de biologia molecular, também se passou a utilizar o DNA mitocondrial como marcador. A detecção de marcadores do genoma nuclear iniciou-se com análises de polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA, obtidos através do tratamento do DNA com

enzimas de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism” - RFLP) (Grodzicker *et al.* 1974). Posteriormente, o advento da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988) permitiu a descrição de outros marcadores moleculares como microssatélites (ou SSR - “Simple Sequence Repeats”), RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (Vos *et al.* 1995) e SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”). A Tabela 1 mostra, de forma geral, alguns dos marcadores moleculares mais utilizados atualmente, bem como suas características e potenciais aplicações.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas metodologias que empregam diferentes tipos de marcadores de DNA, aliados às técnicas de clonagem e seqüenciamento, vários estudos vêm sendo desenvolvidos em diferentes grupos animais e vegetais. Em peixes, análises envolvendo marcadores de DNA vêm sendo direcionadas à caracterização e identificação de espécies, populações e híbridos, inferências filogenéticas, determinação de estruturas populacionais, identificação de linhagens, determinação da variação genética em populações selvagens e cultivadas, avaliação do impacto genético da introdução de espécies cultivadas em populações naturais, determinação de estratégias para fins de criação e repovoamento e localização de marcadores ligados a genes envolvidos com caracteres de interesse econômico, entre outras aplicações (Liu & Cordes 2004; Chauhan & Rajiv 2010).

Além disso, marcadores moleculares sexo-específicos têm sido isolados e caracterizados em diferentes espécies deste grupo de vertebrados, visando não

somente a sexagem de indivíduos adultos e embriões, como também sua utilização em estudos de determinação sexual, manipulação genética, genes candidatos, mapeamento gênico, hermafroditismo, unisexualidade, ginogênese e androgênese, reversão sexual e em programas de reprodução artificial (Griffiths *et al.* 2000; Kovacs *et al.* 2001; Ferguson *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009; Xia *et al.* 2010).

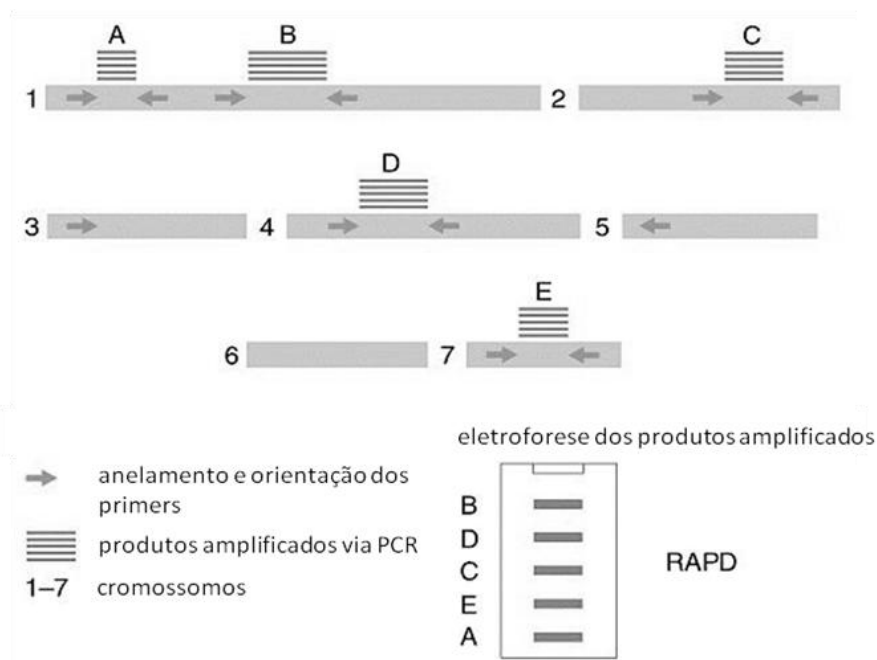
**Tabela 1:** Principais marcadores moleculares utilizados atualmente, incluindo suas características e potenciais aplicações (modificado de Liu & Cordes 2004).

<b>Tipo de marcador</b>	<b>Exige informação molecular prévia</b>	<b>Polimorfismo ou abrangência</b>	<b>Maiores aplicações</b>
Alozymas	Sim	Baixo	mapas de ligação, estudos populacionais
DNA Mitocondrial (DNAMt)	Não	Baixo	estudos populacionais, relações de parentesco
“Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP)	Sim	Baixo	mapas de ligação, estudos populacionais
“Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)	Não	Intermediário	identificação de espécies e híbridos, estudos populacionais
“Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP)	Não	Alto	mapas de ligação, estudos populacionais
Minissatélites	Sim	Alto	relações de parentesco
Microssatélites (SSR)	Sim	Alto	mapas de ligação, relações de parentesco, estudos populacionais
“Expressed Sequence Tags” (EST)	Sim	Baixo	expressão gênica
“Single Nucleotide Polymorphism” (SNP)	Sim	Alto	estudos populacionais, diagnóstico

### 1.3.1 RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) ou AP-PCR (“Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”), técnicas descritas independentemente por

Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990), respectivamente, baseiam-se na identificação de polimorfismos do DNA através da amplificação de múltiplas regiões do genoma, utilizando um único primer de pequeno tamanho (geralmente com 10 bases) e seqüência arbitrária com conteúdo mínimo de 50% guanina-citosina, em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos amplificados são visualizados como uma série de fragmentos, de tamanhos geralmente entre 100-2000 pares de bases, detectados através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática da metodologia de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) em que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é realizada com um único primer decâmico, levando à amplificação de diversas regiões do genoma (retirado de <http://www.mun.ca/biology>, com modificações).

Embora as baixas temperaturas utilizadas em RAPD-PCR permitam o anelamento do primer a diversas regiões do genoma que podem não ser totalmente complementares, os polimorfismos detectados através da técnica de RAPD, visualizados como presença ou ausência de um fragmento específico, podem também estar relacionados a deleções/inserções, inversões ou substituições no sítio de hibridação do primer - uma única alteração de base no DNA parece ser suficiente para originar diferenças no padrão de segmentos amplificados (Williams *et al.* 1990).

A maioria dos marcadores RAPD é dominante e, portanto, não é possível distinguir se um segmento de DNA amplificado relaciona-se a um loco heterozigoto (1 cópia) ou homozigoto (2 cópias). Marcadores RAPD co-dominantes, observados como segmentos de tamanhos diferentes amplificados de um mesmo loco, são raramente identificados (Williams *et al.* 1990) e presumivelmente surgem através de pequenas deleções ou inserções dentro da região amplificada. Dados experimentais de mapeamento genético em diversas espécies indicam que os locos de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, ou seja, pertencem a diversas classes de DNA, desde sequências de cópia única até altamente repetitivas (Grattapaglia & Sederoff 1994; Plomion *et al.* 1995).

Devido à simplicidade, à rapidez e ao baixo custo, a técnica de RAPD tornou-se amplamente utilizada em diferentes organismos. Estudos empregando estes marcadores vêm sendo realizados em distintas espécies de peixes visando a identificação de espécies (Dinesh *et al.* 1993; Borowsky *et al.* 1995; Sultmann *et al.* 1995; Partis & Wells 1996; Callejas & Ochando 1998; Gasper *et al.* 2001; Barman

*et al.* 2003; Brahmane *et al.* 2008), de subespécies (Bardacki & Skibinski 1994; Williams *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 2008) de híbridos (Elo *et al.* 1997; Appleyard & Mather 2000; Chelomina *et al.* 2008; You *et al.* 2009), de linhagens (Shikano & Taniguchi 2002; Degani, 2004), análises de polimorfismos populacionais (Johnson *et al.* 1994; Macaranas *et al.* 1995; Caccone *et al.* 1997; Nadig *et al.* 1998; Maltagliati *et al.* 2003; Exadactylos *et al.* 2003; Basavaraju *et al.* 2007; Ghosh & Alam 2008; Saini *et al.* 2010), comparações entre populações naturais e cultivadas (Bielawski & Pumo 1997; Koh *et al.* 1999; Yoon & Park 2002; Wasko *et al.* 2004; Rahman *et al.* 2009), identificação de indivíduos ginogenéticos (Chen & Leibenguth 1995; Zhou *et al.* 2000a,b, 2001; Yan *et al.* 2005) e androgenéticos (Corley-Smith *et al.* 1996; Bercsenyi *et al.* 1998), mapeamento gênico (Postlewait *et al.* 1994; Kazianis *et al.* 1996; Ali *et al.* 2004), identificação de características de importância econômica (Dinesh *et al.* 1993; Araneda *et al.* 2009) e identificação de marcadores sexo-específicos (Iturra *et al.* 1997; Kovács *et al.* 2001; Wuertz *et al.* 2006; Keyvshokoo *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009).

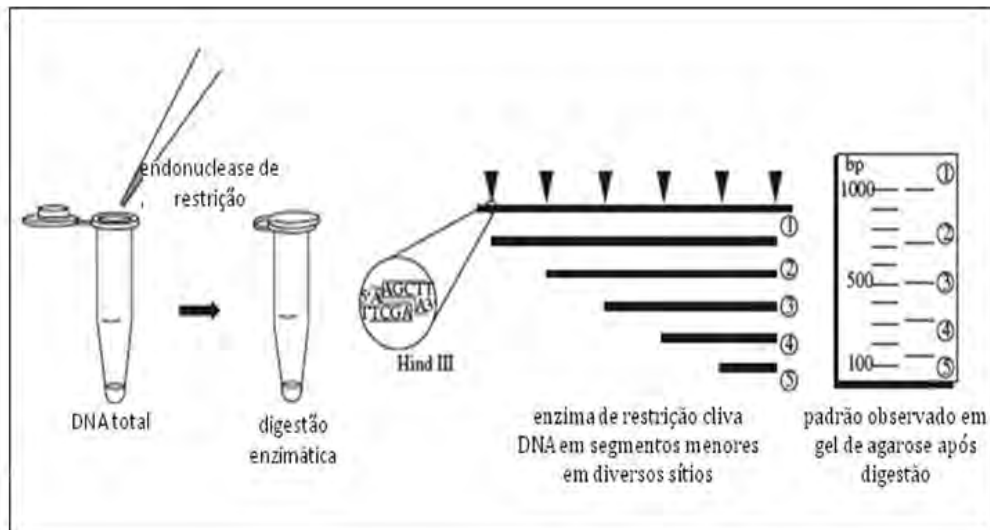
Embora o número de estudos envolvendo marcadores RAPD em espécies de peixes seja vasto, a ampliação das análises genéticas em peixes Neotropicais poderá fornecer maiores contribuições à caracterização genética de diferentes espécies e/ou populações deste grupo.

### **1.3.2 DNA satélite**

Grande parte do genoma dos eucariotos é composta por DNA repetitivo “em tandem”, representado por três classes distintas com diferentes tamanhos,

propriedades e distribuições genômicas. Duas destas classes são compostas pelos chamados microssatélites e minissatélites, que correspondem a seqüências curtas que variam de 1 a 5 pares de bases ou até cerca de 100 pares de bases, respectivamente, em arranjos repetidos entre 10 a 100 vezes (Alberts *et al.* 1994). Embora os arranjos tanto de microssatélites quanto de minissatélites encontrem-se dispersos pelo genoma, os minissatélites geralmente são encontrados em regiões cromossômicas subteloméricas (Li 1997). A terceira classe de DNA repetitivo “em tandem” compreende os DNAs satélites (satDNA), assim denominados por se diferenciarem do restante do DNA genômico em experimentos de separação por densidade de gradiente (Charlesworth *et al.* 1994).

O isolamento de DNAs repetitivos por digestão enzimática representa a metodologia mais comumente aplicada para identificar repetições satélites em um grande número de espécies (e.g. Vicari *et al.* 2010). Neste procedimento, DNA total é digerido com enzimas de restrição e, posteriormente, submetido à eletroforese em gel de agarose. A digestão de um determinado DNA satélite por uma nuclease que reconhece um sítio de restrição na unidade repetitiva gera fragmentos de igual tamanho ou de tamanhos muito similares em sítios regularmente espaçados (Lewin 2001) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática da metodologia para obtenção e isolamento de DNAs satélites através de digestão enzimática (modificado de Vicari *et al.* 2010).

DNAs satélites representam uma porção do genoma altamente repetitiva, não codificadora e organizada “em tandem”, com unidades de cerca de 100-300 pares de bases (Sumner 1990; Epplen & Epplen-Haupt 2002). Cada uma destas unidades pode estar presente em centenas a milhares de cópias em um genoma e diversas famílias de DNAs satélite podem co-existir em um mesmo organismo. Diferentes famílias de DNA satélite têm sido isoladas, caracterizadas e localizadas em cromossomos de diversas espécies, evidenciando uma grande correlação com regiões de heterocromatina constitutiva (Miklos 1985; John 1988; Lohe *et al.* 1993; Lohe & Hilliker 1995). Unidades monoméricas repetidas são comumente detectadas nas regiões centroméricas e teloméricas de alguns ou de vários cromossomos de um determinado organismo, associadas a blocos de heterocromatina constitutiva (Tyler-Smith & Willard 1993). Além da



quantidade e da localização de seqüências específicas de DNA satélite variarem grandemente entre espécies distintas, estas muitas vezes mostram-se espécie-específicas, o que sugere não somente uma origem distinta, como também pode ser resultado de um processo evolutivo dinâmico que leva à contínua geração, amplificação, eliminação e substituição de famílias de DNAs satélites (Charlesworth *et al.* 1994).

Embora análises envolvendo repetições de DNA satélite venham sendo realizadas em um grande número de eucariotos, especialmente mamíferos (Singh *et al.* 1980; Dibartolomeis *et al.* 1992; Capriglione *et al.* 1994; Rajyashri & Singh 1995; Ivanov & Modi 1996; Subramanian *et al.* 2003; Li *et al.* 2005; Krzywinski *et al.* 2005; Bulazel *et al.* 2006; Navaias-Perez *et al.* 2006), ainda se conhece muito pouco sobre a composição molecular de diferentes tipos de DNAs satélites em outros grupos de vertebrados. Estudos em diferentes espécies de peixes teleósteos têm demonstrado que repetições de DNA satélite podem ser úteis em estudos filogenéticos (De La Herrán *et al.* 2001; Saito *et al.* 2007), para clarificar citotaxonomicamente complexos de espécies (Mantovani *et al.* 2004; Vicari *et al.* 2008; Kantek *et al.* 2009), determinar origens de cromossomos supernumerários (Mestriner *et al.* 2000; Jesus *et al.* 2003; Ziegler *et al.* 2003; Artoni *et al.* 2006) e caracterizar cromossomos sexuais (Nakayama *et al.* 1994; Matsuda *et al.* 1997; Devlin *et al.* 2001; Centofante *et al.* 2002; Vicente *et al.* 2003; Vicari *et al.* 2006).

A ampliação de estudos acerca da composição e distribuição de diferentes famílias de DNAs satélites em peixes poderá fornecer maiores

contribuições à caracterização genética de diferentes espécies e à compreensão da evolução do genoma dos peixes, com especial foco em domínios de heterocromatina.

## **2 OBJETIVOS**

Considerando a relevância biológica, bem como a importância econômica das espécies do gênero *Brycon* e também que estudos genéticos neste grupo de peixes ainda são escassos, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Identificar e caracterizar segmentos de DNA associados ao sexo em *Brycon cephalus*.
- 2) Isolar e caracterizar segmentos de DNA repetitivo dos genomas de *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyianus* que possam corresponder a repetições de DNA satélite.
- 3) Gerar dados que contribuam para a melhor caracterização genética de espécies do gênero *Brycon* e informações acerca da diferenciação e evolução deste grupo de peixes teleósteos.
- 4) Gerar subsídios à melhor compreensão dos mecanismos de evolução de segmentos de DNA associados ao sexo e acerca da dinâmica e evolução de DNAs repetitivos em peixes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Exemplares de duas espécies de peixes do gênero *Brycon* - *B. cephalus* Günther, 1860 (matrinchã da Amazônia) (Figura 3) e *B. orbignyanus* Valenciennes, 1849 (piracanjuba) (Figura 4) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) - foram utilizados como principais materiais de estudo. Os animais foram obtidos no Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CEPTA/IBAMA) (Pirassununga, SP). Adicionalmente, exemplares de *B. lundii* Reinhardt, 1867 (Rio São Francisco, Três Marias, MG) foram também utilizados em análises complementares.



**Figura 3:** Exemplar de *Brycon cephalus* (matrinchã da Amazônia).



**Figura 4:** Exemplar de *Brycon orbignyanus* (piracanjuba).

Todos os exemplares analisados de cada uma das espécies provenientes do CEPTA/IBAMA tiveram basicamente as mesmas condições de manejo, densidade de estocagem e regime de alimentação - a densidade média de estocagem foi de 250g/m<sup>2</sup> e a temperatura média anual e a quantidade de oxigênio dissolvido na água foram de 26°C e 5.5ppm, respectivamente. A identificação do sexo dos animais foi feita através de inspeção visual das gônadas dissecadas, sob estéreo microscopia.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Extração e quantificação de DNA**

A extração de DNA total de animais sexualmente maduros foi realizada através de dois protocolos distintos, de acordo com o tipo de tecido utilizado. O isolamento de DNA de pedaços de nadadeiras caudal e/ou anal foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Wasko *et al.* (2003) e o isolamento de

DNA de fígado foi realizado segundo a metodologia descrita em Sambrook & Russel (2001). Ambos protocolos utilizados encontram-se descritos abaixo.

Extração de DNA de nadadeira: Coletar 100-300mg de nadadeira (1 a 2 cm<sup>2</sup>), com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça, e fixar o material em etanol 95% - 100µM EDTA pH 8.0 em tubos de 1.5ml. Secar o tecido em papel de filtro, para retirar o excesso de fixador, cortá-lo em pequenos pedaços e misturá-lo ao tampão de digestão TNES-uréia (Tris-HCl 10mM pH 8.0; NaCl 125mM; EDTA 10mM pH 8.0; SDS 0.5%; uréia 4M) em um tubo de 15ml. Adicionar 30µl de RNase (10mg/ml) e incubar a 42°C em banho-maria por 1 hora. Após este período, acrescentar 30µl de Proteinase K (10mg/ml) e manter o tecido a 42°C em banho-maria por, no mínimo, 10 horas. Adicionar 4ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo. Inverter o tubo cuidadosamente por 15 minutos e centrifugá-lo a 10.000 rpm por 15 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta, remover o sobrenadante para um novo tubo e precipitar o DNA em NaCl (1M) e dois volumes de etanol absoluto gelado, invertendo o tubo diversas vezes. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e lavar o DNA em cerca de 1ml de etanol 70%. Centrifugar o tubo a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, secar o DNA à temperatura ambiente ou em estufa a 37°C e re-suspender em um volume apropriado (geralmente 1ml) de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0). Depois de completamente dissolvido, manter o DNA a -20°C em tubos de 1.5ml.

Extração de DNA de fígado: Coletar os tecidos desejados, com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça, e fixar o material em metanol:etanol (1:1) em tubos de 1.5ml. Secar o tecido em papel de filtro, para retirar o excesso de fixador. Colocar pequenos pedaços de tecido em uma cubeta mantida no gelo e macerá-los em nitrogênio líquido, com auxílio de um bastão. Adicionar 5ml de solução de digestão (NaCl 0.4M, EDTA 0.1M pH

8.0, Proteinase K 100µg/ml, SDS 0.1%) sobre o tecido já macerado. Manter o material ao banho-maria a 50°C, em um tubo de centrifuga, durante 4 horas, agitando periodicamente. Adicionar fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) ao material, em um volume igual ao da solução homogeneizada, e agitar os tubos suavemente durante 30 minutos. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 10 minutos e passar o sobrenadante, com o auxílio de uma micropipeta, para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, acrescentar NaCl 1M e 2 volumes de etanol absoluto gelado e inverter o tubo diversas vezes. Centrifugar o material a 10.000 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante. Adicionar cerca de 100µl de etanol 70% ao tubo e centrifugá-lo a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartar novamente o sobrenadante e secar o DNA em estufa a 37°C durante 12-14 horas. Depois de seco, dissolver o DNA em 1ml de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM). Tratar a amostra com RNase (100µg/ml) a 37°C por 1 hora em banho-maria e novamente realizar o tratamento com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico para re-extração do DNA. Depois de precipitar o DNA, dissolvê-lo novamente em cerca de 1ml de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM) e armazená-lo a -20°C em tubos de 1.5ml.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com Brometo de Etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russel 2001) ou GelRed (10mg/ml) (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Hoefer UV-25). Para quantificação do DNA, foi utilizado o programa computacional Stratagene EagleSight - versão 3.22 (Agilent Technologies Stratagene) para foto-documentação de géis, através de comparação direta com um marcador padrão de peso molecular e concentração

conhecidos. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram também avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer- Thermo Fisher Scientific), através da comparação de absorbância a 260-280nm.

### 3.2.2 Digestão Enzimática de DNA total

Amostras de DNA total de *Brycon cephalus* foram digeridas, separadamente, com 23 diferentes enzimas de restrição (*AccI*, *AluI*, *Apal*, *AsuI*, *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindIII*, *HinfI*, *MseI*, *MspI*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *SacI*, *XbaI*, *XmnI* e *XhoI*). As enzimas de restrição *HindIII*, *EcoRI*, *BglII*, *KpnI* e *XhoI* foram utilizadas para digestão de amostras de DNA total de *B. orbignyana*. Uma dinâmica de digestão foi realizada para cada enzima, utilizando diferentes tempos de clivagem (1U/μg de DNA por 20 minutos, 1 hora e 4 horas, e 5U/μg de DNA por 14 horas). O protocolo utilizado para clivagem das amostras de DNA encontra-se detalhado abaixo.

Digestão enzimática: Incubar, em banho-maria a 37°C, amostras de DNA total íntegro em um volume apropriado de enzima de restrição (1U/μg ou 5U/μg) e de tampão 10x, seguindo as especificações dos fabricantes, em um volume total de 100μl. Precipitar o DNA digerido em NaCl 100mM e 2 volumes de etanol 100% gelado. Deixar 10-12 horas a 4°C ou cerca de 3 horas a -70°C. Centrifugar a 10.000rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar 100μl de etanol 70% gelado. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar o DNA em estufa a 37°C. Adicionar 10μl de água destilada.

As amostras de DNA digeridas foram separadas através de eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TAE (Tris-Ácido Acético-EDTA), durante 2 horas a 110V/150A. Fragmentos de DNA foram identificados com Brometo de Etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russell 2001) ou GelRed (10mg/ml) (Biotium), sob transiluminador ultravioleta. Os pesos moleculares dos fragmentos de DNA foram estimados usando marcadores de peso molecular padrão. O sistema de documentação computacional Stratagene EagleSight - versão 3.22 (Agilent Technologies Stratagene) foi utilizado para obter imagens digitais dos géis de agarose e identificar fragmentos de DNA.

### **3.2.3 RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)**

Sessenta oligonucleotídeos decâmeros do kit OPP (Operon Technologies) e seis oligonucleotídeos fornecidos pelo kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (GE Healthcare Life Sciences), com conteúdos de bases G+C variando entre 60-70% (Tabela 2), foram utilizados como primers únicos em PCR. Inicialmente, foram amplificados “pools” de DNA de fêmeas e “pools” de DNA de machos (compostos de DNA de 10 indivíduos) de *Brycon cephalus*, separadamente, seguindo as instruções do fabricante do kit de RAPD. Posteriormente, amostras individuais de DNA de cada animal desta espécie foram também utilizadas, separadamente, para amplificação de marcadores RAPD visando minimizar a identificação de variações não associadas ao sexo. Além disso, todas as amplificações foram realizadas em duplicata e com diferentes concentrações de DNA, com o intuito de identificar variações artificiais. Um controle negativo, sem



amostra de DNA, foi também incluído em cada reação de amplificação para monitorar qualquer possível contaminação. O procedimento de amplificação de marcadores RAPD utilizado encontra-se descrito abaixo.

RAPD-PCR: Colocar, em um tubo de 0,2ml, 1,5µl de primer (25µM), 1,0µl de DNA (25, 50 ou 100 ng), 2,5µl de tampão de reação 10x, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 4,0µl de dNTP (0,4mM) e 0,25µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl). Completar com água destilada autoclavada para um volume final de 25µl e misturar delicadamente a solução, com auxílio de uma micropipeta. Proceder a amplificação das amostras de DNA em aparelho termociclador com um passo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos a 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Incluir um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos decâmeros utilizados como primers únicos em RAPD-PCR, sequências correspondentes e conteúdo de bases GC.

Primer	Seqüência (5' - 3')	G+C (%)
Ready-To-Go 1	GGTGCGGGAA	70
Ready-To-Go 2	GTTTCGCTCC	60
Ready-To-Go 3	GTAGACCCGT	60
Ready-To-Go 4	AAGAGCCCGT	60
Ready-To-Go 5	AACGCGCAAC	60
Ready-To-Go 6	CCCGTCAGCA	70
OPP-1	GTAGCACTCC	60
OPP-2	TCGGCACGCA	70
OPP-3	CTGATACGCC	60
OPP-4	GTGTCTCAGG	60
OPP-5	CCCCGGTAAC	70
OPP-6	GTGGGCTGAC	70
OPP-7	GTCCATGCCA	60
OPP-8	ACATCGCCCA	60
OPP-9	GTGGTCCGCA	70
OPP-10	TCCCGCCTAC	70
OPP-11	AACGCGTCGG	70
OPP-12	AAGGGCGAGT	60

continuação

OPP-13	GGAGTGCCTC	70
OPP-14	CCAGCCGAAC	70
OPP-15	GGAAGCCAAC	60
OPP-16	CCAAGCTGCC	70
OPP-17	TGACCCGCCT	70
OPP-18	GGCTTGGCCT	70
OPP-19	GGGAAGGACA	60
OPP-20	GACCCTAGTC	60
OPP-21	CAGGCCCTTC	70
OPP-22	TGCCGAGCTG	70
OPP-23	AGTCAGCCAC	60
OPP-24	AATCGGGCTG	60
OPP-25	AGGGGTCTTG	60
OPP-26	GGTCCCTGAC	70
OPP-27	GAAACGGGTG	60
OPP-28	GTGACGTAGG	60
OPP-29	GGGTAACGCC	70
OPP-30	GTGATCGCAG	60
OPP-31	CAATCGCCGT	60
OPP-32	TCGGCGATAG	60
OPP-33	CAGCACCCAC	70
OPP-34	TCTGTGCTGG	60
OPP-35	TTCCGAACCC	60
OPP-36	AGCCAGCGAA	60
OPP-37	GACCGCTTGT	60
OPP-38	AGGTGACCGT	60
OPP-39	CAAACGTCGG	60
OPP-40	GTTGCGATCC	60
OPP-41	TTCGAGCCAG	60
OPP-42	GTGAGGCGTC	70
OPP-43	GGGGGTCTTT	60
OPP-44	CCGCATCTAC	60
OPP-45	GATGACCGCC	70
OPP-46	GAACGGAICTC	60
OPP-47	GTCCCGACGA	70
OPP-48	TGGACCGGTG	70
OPP-49	CTCACCGTCC	70
OPP-50	TGTCTGGGTG	60
OPP-51	AAAGCTGCGG	60
OPP-52	TGTCATCCCC	60
OPP-53	AAGCCTCGTC	60
OPP-54	TGCGTGCTTG	60
OPP-55	GACGGATCAG	60
OPP-56	CACACTCCAG	60
OPP-57	TTCCCCCCAG	70
OPP-58	TGAGTGGGTG	60
OPP-59	GTTGCCAGCC	70
OPP-60	ACTTCGCCAC	60

---

Os produtos de reação de amplificação (8 $\mu$ l) foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante 4.5-6.5 horas a 110V/150A. As bandas de DNA foram visualizadas usando Brometo de Etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russell 2001) ou GelRed (10mg/ml) (Biotium) sob transiluminador de luz ultravioleta. Para fotografar o gel e identificar fragmentos de DNA, foi utilizado o sistema computacional EagleSight versão 3.22 de documentação de imagem (Agilent Technologies Strategene) e os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através de comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

#### **3.2.4 Purificação de fragmentos de DNA de interesse de gel de agarose**

A purificação de fragmentos de DNA de interesse de gel de agarose, obtidos de *B. cephalus* e de *B. orbignyana*, foi realizada utilizando o kit QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante, como descrito a seguir.

Isolamento de DNA de gel de agarose: Pesar um tubo de 1.5ml vazio e anotar o peso. Cortar a banda de interesse do gel de agarose, sob transiluminador ultravioleta, e colocá-la no tubo. Cortar o pedaço de gel em vários pedaços menores, utilizando uma tesoura ou uma pinça. Pesar novamente o tubo e calcular o peso do fragmento de agarose. Adicionar 10 $\mu$ l de “Capture Buffer” para cada 10mg de gel e misturar em vortex. Incubar a 60°C em banho-maria até que a agarose dissolva (5-15 minutos). Centrifugar brevemente o tubo e coletar, com uma micropipeta, a amostra de agarose

dissolvida. Transferir a amostra para uma Coluna GFX colocada em um tubo coletor e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar o tubo coletor com a Coluna GFX a 10.000rpm por 30 segundos. Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a Coluna GFX novamente no tubo coletor. Adicionar 500µl de “Wash Buffer” à Coluna GFX e centrifugar a 10.000rpm por 30 segundos. Descartar o tubo coletor e transferir a Coluna GFX para um novo tubo de 1.5ml. Aplicar 50µl de tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0) diretamente sobre a fibra de vidro da Coluna GFX. Incubar a amostra à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000rpm por 1 minuto para recuperar o DNA. Estocar o DNA purificado a -20°C. Estimar o produto final em gel de agarose 1% ou em espectrofotômetro.

### **3.2.5 Clonagem de fragmentos de DNA**

#### **3.2.5.1 Ligação inserto-plasmídeo**

Fragmentos de DNA de interesse purificados de gel de agarose foram ligados a plasmídeos específicos (pGEM-T e/ou pMOS), seguindo as especifica es dos fabricantes. Os protocolos utilizados encontram-se descritos abaixo.

Liga o em plasmídeo pGEM-T (utilizando o kit de liga o pGEM-T Vector System I - Promega): Em um tubo de 0.5ml, adicionar 2µl do inserto de interesse (produto de DNA resultante de PCR), 1µl de T4 DNA ligase, 1µl de tampão de rea o 10x, 1µl do plasmídeo pGEM-T (50ng) e 5µl de  gua. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a rea o a 4°C durante 12-16 horas.

Ligação em plasmídeo pMOS (utilizando o kit pMOS*Blue* Blunt Ended Cloning - GE Healthcare Life Sciences): Em um tubo de 1.5ml, adicionar 2µl do inserto de interesse (fragmento de DNA), 1µl de mix de enzima pK, 1µl de tampão de reação 10x, 0.5µl de DTT 100mM em um volume final de 10µl. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 22°C durante 40 minutos. Aquecer o material a 75°C durante 10 minutos. Manter o material em gelo durante 2 minutos. Adicionar 1µl do vetor pMOS*Blue* (50ng/µl) e 1µl de T4 DNA ligase. Incubar a 22°C durante 2-14 horas.

### **3.2.5.2 Transformação de bactérias competentes**

Posteriormente à ligação do inserto de interesse ao plasmídeo, foi realizada a transformação de bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl), seguindo as instruções do fabricante, conforme descrito abaixo.

Transformação de bactérias competentes: Manter um tubo de 1.5ml estéril no gelo. Colocar 50µl de bactérias competentes (acondicionadas a -70°C) no tubo e posteriormente adicionar 10µl da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37°C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950µl de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5) à temperatura ambiente e incubar a 37°C por 1 hora, sob agitação a 225rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, ágar 1.5%, pH 7.5), contendo 2µl de ampicilina (50mg/ml) por mililitro de meio LB e 50µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-

galactoside) (50mg/ml), para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C durante 12-16 horas.

### **3.2.5.3 Identificação de plasmídeos recombinantes**

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as ligações inserto-plasmídeo foram submetidas a reações de amplificação (PCR), seguindo o protocolo descrito abaixo.

PCR para identificação de plasmídeos recombinantes: Em um tubo de 0.5ml, adicionar 50pmol de cada primer - M13F (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') e M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') -, tampão de reação 1x (KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Tris-HCl 10mM), 2mM de cada dNTP e 0.5U de *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare Life Sciences), em um volume total de 50µl. Encostar um palito estéril sobre uma colônia recombinante de interesse e mergulhar o palito no tubo de 0.5ml contendo as soluções para amplificação. As reações de amplificação são realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação a 63°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Submeter os produtos da reação de amplificação (6µl) à eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante 1.5-2 horas a 110V/150A, posteriormente corado com brometo de etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russell 2001) para verificar a presença de recombinantes de interesse. Identificar insertos presentes nos plasmídeos através da análise do gel sob luz ultravioleta em transiluminador, utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação (1Kb Plus

Ladder DNA – Gibco.Brl). Após identificação dos clones de interesse, estocá-los a -70°C em glicerol 15%.

#### **3.2.5.4 Mini-preparações para obtenção de plasmídeos recombinantes**

Reações de mini-preparações (para retirada dos plasmídeos das bactérias) foram realizadas para posterior caracterização dos segmentos de DNA clonados e sua utilização como sondas em experimentos de hibridação em membrana. A metodologia refere-se à técnica de lise alcalina, descrita em Sambrook & Russell (2001), conforme discriminado abaixo.

Crescimento das bactérias em meio de cultura líquido: Coletar, com o auxílio de uma ponteira ou palito de madeira estéreis, colônias de bactérias recombinantes (colônias brancas) das placas de Petri. Colocar o material recolhido em tubos de 15ml estéreis contendo 4ml de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5). Manter os tubos a 37°C durante 12-16 horas, sob agitação a 225rpm. Utilizar o material nas reações de mini-preparações.

Mini-preparações para obtenção de plasmídeos: Centrifugar cerca de 1.5ml de meio de cultura em um tubo de 1.5ml estéril, por 15 segundos a 13.000rpm. Retirar todo o sobrenadante com uma micropipeta e ressuspender o “pellet” em 100µl de solução A gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM). Adicionar 200µl de solução B (SDS 1%, NaOH 0.2M), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Adicionar 150µl de solução C (acetato de potássio 5M pH 4.8), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Centrifugar o tubo por 5 minutos a 13.000rpm e transferir o sobrenadante, com uma micropipeta, para um novo tubo. Adicionar 0.5ml de fenol:clorofórmio (1:1), misturar e

centrifugar por 2 minutos a 13.000rpm. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar dois volumes de etanol 100% gelado. Misturar invertendo o tubo cuidadosamente por dez vezes e deixar à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante. Lavar o “pellet” com 100µl de etanol gelado 70% e deixar secar à temperatura ambiente ou em estufa a 37°C. Adicionar 30µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) com RNase 20µg/ml, misturar e guardar a -20°C.

### **3.2.6 Sequenciamento nucleotídico**

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Life Sciences) e seqüenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer), seguindo as especificações dos fabricantes, como descrito abaixo.

Sequenciamento nucleotídico: Preparar a reação de sequenciamento contendo 2µl de pré-mix (fornecido no kit), 2µl do produto purificado e 1µl de primer (10µM). Realizar as reações em termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> - MJ Research) seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Adicionar às amostras 2µl de acetato de sódio 4.5mM e 80µl de etanol 95%. Centrifugar a 14.000rpm durante 20 minutos a 20°C. Remover o sobrenadante e adicionar 400µl de etanol 70%. Centrifugar novamente a 14.000rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37°C por 1 hora, protegido da luz. Dissolver as amostras em solução de



formamida e “blue dextran” (Formamide Loading Dye 5:2). Limpar a placa dupla de vidro com álcool, em que será colocado o gel de poliacrilamida. Colocar o pente na placa de vidro para formar os sulcos onde serão aplicadas as amostras de DNA. Colocar a placa em um forno de luz ultravioleta, inserir o gel de poliacrilamida (RapidGel<sup>TM</sup>-XL6% - GE Healthcare Life Sciences), com uma seringa, na placa dupla de vidro. Ligar a luz ultravioleta durante 3 minutos para polimerizar a poliacrilamida. Limpar novamente a placa de vidro, para evitar erros de leitura no sequenciamento. Colocar o gel no seqüenciador automático e encher as cubas superior e inferior do seqüenciador com tampão TBE 1x (Tris-Ácido bórico-EDTA). Desnaturar as amostras de DNA a 80°C por 4 minutos, em termociclador, e colocá-las imediatamente em gelo. Determinar a voltagem (1.400V) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) no programa computacional e identificar as linhas de leitura com o número correspondente das amostras. Aplicar 2µl de cada amostra em sua linha correspondente no gel. Iniciar a corrida do gel.

### **3.2.7 Análise das seqüências nucleotídicas**

Para identificação de possíveis similaridades com seqüências previamente descritas, as seqüências nucleotídicas obtidas neste trabalho foram primeiramente submetidas a buscas “online” BLASTN e BLASTX (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul *et al.* 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). O alinhamento das seqüências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) e as seqüências consenso foram determinadas manualmente.

### 3.2.8 Hibridação em membrana

O procedimento de hibridação em membrana (“dot-blotting”) foi realizado com o kit AlkPhos Direct Labeling and Detection System CDP-Star (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as especificações do fabricante. Foram utilizadas amostras de DNA de 10 machos e de 10 fêmeas de *Brycon cephalus*. Como sonda, foi usado um fragmento de DNA isolado de fêmeas desta espécie, através de RAPD. A metodologia utilizada encontra-se descrita abaixo.

“Dot-blotting” e Marcação da sonda: Desnaturar as amostras de DNA (100 ng) em água fervente durante 10 minutos e, posteriormente, colocar em gelo. Aplicar as amostras de DNA (2µl), com auxílio de uma micropipeta, em uma membrana de nylon (Hybond-N) (GE Healthcare Life Sciences). Incubar a membrana a 80°C durante 2 horas, para fixar as amostras de DNA. Para marcar a sonda, desnaturar a amostra de DNA (10ng/µl) em água fervente durante 5 minutos e, após este tempo, transferir imediatamente para um recipiente com gelo. Adicionar 10µl de tampão de reação e 2µl de reagente de marcação à sonda. Adicionar 10µl de solução “cross linker” à sonda. Incubar a reação a 72°C por 30 minutos. Utilizar a sonda imediatamente ou mantê-la em gelo por até 2 horas até seu uso. Alternativamente, a sonda marcada poderá ser estocada por um período maior em glicerol 50%.

Hibridação em membrana: Aquecer o tampão de hibridação a 55°C (volume de 0.25ml/cm<sup>2</sup> de membrana). Realizar uma pré-hibridação da membrana no tampão de hibridação por pelo menos 15 minutos a 55°C, em forno de hibridação ou banho-maria com movimento constante. Adicionar a sonda marcada ao tampão de hibridação (5-10ng de sonda para cada ml de tampão de hibridação). Realizar a hibridação durante 12-14 horas a 55°C em forno de hibridação ou em banho-maria com movimento. Aquecer o tampão de lavagem

primário a 55°C (volume de 2-5ml/cm<sup>2</sup> de membrana). Transferir a membrana para esta solução e manter a 55°C durante 10 minutos, sob agitação leve. Realizar uma nova lavagem da membrana em tampão primário a 55°C por 10 minutos. Colocar a membrana em um recipiente e cobri-la com tampão de lavagem secundário. Manter nesta solução por 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação leve. Realizar uma nova lavagem da membrana em tampão secundário por 5 minutos, à temperatura ambiente. Retirar o excesso de tampão da membrana e colocá-la sobre uma superfície de vidro com as amostras de DNA voltadas para cima. Colocar sobre a membrana, com o auxílio de uma micropipeta, reagente de detecção (30-40µl/cm<sup>2</sup>) e manter por 2 a 5 minutos. Envolver a membrana em filme plástico e colocá-la dentro de um filme cassete. Expor a membrana a um filme auto-radiográfico durante 1 hora, à temperatura ambiente. Retirar o filme auto-radiográfico e proceder sua revelação.

Para quantificação dos sinais de hibridação, uma análise quantitativa foi realizada com o programa computacional Scion Image (<http://www.scioncorp.com>).

### **3.2.9 Desenvolvimento de marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”)**

Com base na sequência nucleotídica de um fragmento de RAPD isolado de fêmeas de *Brycon cephalus*, um conjunto de primers (F: 5'TACCTAGAGAATCTACAAGG3', R: 5' TGAATGTACCATGACTGTCTA3') foi desenhado com auxílio do programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000), visando desenvolver um marcador SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”). Reações de amplificação foram realizadas com amostras de DNA de

10 machos e 10 fêmeas de *B. cephalus*, 1 macho e 1 fêmea de *B. orbignyanus* e 1 macho e 1 fêmea de *B. lundii*. Todas as reações de amplificação foram realizadas simultaneamente com todas as amostras. O protocolo utilizado encontra-se descrito abaixo. Um controle negativo, sem inclusão de DNA, foi também utilizado para monitorar qualquer possível contaminação.

PCR-SCAR: Colocar, em um tubo de 0,2ml, 0,5µl de primer (0.3µM), 1,0µl de DNA (100ng), 2,5µl de tampão de reação 10x, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µl de dNTP (8mM) e 0,25µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl). Completar com água destilada autoclavada para um volume final de 25µl e misturar delicadamente a solução, com auxílio de uma micropipeta. Proceder a amplificação das amostras de DNA em aparelho termociclador com um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Incluir um passo final de extensão a 72°C por 2 minutos.

Os produtos de reação de amplificação (8µl) foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.4% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante 2 horas a 110V/150A. As bandas de DNA foram visualizadas usando Brometo de Etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russell 2001) ou GelRed (10mg/ml) (Biotium) sob transiluminador de luz ultravioleta. Para fotografar o gel e identificar fragmentos de DNA, foi utilizado o sistema computacional EagleSight versão 3.22 de documentação de imagem (Agilent Technologies Strategene) e os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através de comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

### 3.2.10 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para obtenção de cromossomos mitóticos de *Brycon cephalus* e *B. orbignyanus* foi utilizada a técnica convencional de preparação direta (“air-drying”), descrita por Egozcue (1971) e por Cestari (1973), e posteriormente adaptada por Foresti *et al.* (1993). Posteriormente, as suspensões celulares foram aplicadas sobre lâminas de vidro. As metodologias utilizadas encontram-se descritas abaixo.

Obtenção de cromossomos mitóticos: Injetar solução aquosa de colchicina 0.025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) intra-abdominalmente nos animais, com uma seringa, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Manter os animais em aquário com bombeamento de ar, por um certo período de tempo (20 minutos a 2 horas). Sacrificar o animal para retirada, com o auxílio de tesoura e de pinças, o rim (anterior e/ou posterior). Lavar rapidamente o material retirado em solução hipotônica (KCl 0.075M) e transferi-lo para uma pequena cuba de vidro contendo 7ml desta mesma solução. Com o auxílio de pinças e de uma seringa de vidro desprovida de agulha, dissociar o material até obter uma suspensão celular homogênea. Transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e manter em estufa a 36-37°C, durante 25-30 minutos. Após este tempo, ressuspender a suspensão com bastante cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e descartar pedaços de tecido ainda não desfeitos. Acrescentar algumas gotas de fixador (álcool metílico 3 : ácido acético 1) recém-preparado ao material e ressuspendê-lo novamente. Deixar à temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 900rpm e descartar o sobrenadante utilizando uma pipeta Pasteur. Acrescentar 5-7ml de fixador recém-preparado, ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e centrifugar a 900rpm

por 15 minutos. Repetir a fixação do material por mais duas vezes e, após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar cerca de 1ml de fixador para ressuspender bem o material obtido. Guardar as preparações celulares obtidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas em tubos de 1.5ml, ou utilizá-las para preparação de lâminas.

Preparação de lâminas: Pingar 3-4 gotas da suspensão sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa e seca mantida sobre uma placa aquecida a  $38-39^{\circ}\text{C}$  ou sobre uma lâmina previamente mergulhada em água quente, formando assim uma fina camada de água sobre esta. Secar o material ao ar. Para verificar a qualidade e quantidade de metáfases, corar a lâmina com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.449M pH 6.8) durante 7-8 minutos. Lavar a lâmina com água e deixar secar.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de capítulos, referentes a trabalhos científicos. As citações bibliográficas não foram listadas nos mesmos a fim de otimizar a apresentação geral da dissertação. Estas citações encontram-se no item “Referências Bibliográficas”.

## **4.1 CAPÍTULO 1**

**Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinchã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characiformes: Characidae)**



## **Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinchã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characiformes: Characidae)**

Running Title: Sex-specific DNA in *Brycon cephalus*

### **Abstract**

The matrinchã *Brycon cephalus*, a commercially important freshwater fish resource, has no heteromorphic sex chromosomes so far described. In the present study, we performed a screening for sex-associated DNA markers in this species, through the use of a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and a genomic DNA restriction digestion analysis. DNA digestions evidenced no differences between sexes. Sixty six random primers were used in pooled and individual DNA samples of males and females and the analysis of the RAPD fingerprints revealed one female sex-associated band. Cloning and sequencing of this band led to the identification of two distinct DNA segments. While one of the isolated fragments showed a significant identity with a described protein gene (phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W - PIGW), the other fragment, composed by 535 bp, corresponds to a novel DNA marker. Further experiments were performed with this second DNA fragment in order to verify its sex-specificity. Data on dot-blot hybridization, using total DNA of both sexes, confirmed its female-specificity in *B. cephalus*. A primer set was designed based on its sequence data and used in PCR with DNA samples of this species, leading to diagnose the animals' sexes with a 100% overall accuracy through a SCAR approach. No amplification results were found for two other species of the genus - *B. orbignyanus* and *B. lundii*. The obtained data can lead to the hypothesis that *B. cephalus* may present heteromorphic sex chromosomes that should be in an early phase of differentiation.

Key words: sex determination, RAPD, enzyme digestion, sex marker

## Introduction

Sex determination is a subject that attracts a lot of attention due its great variation among different species. Although mammals and birds present a XX/XY or a ZZ/ZW sex chromosome system, respectively, the presence and role of sex chromosomes in sex determination and differentiation is not always clear and stable in all vertebrates, particularly in fish species. Most teleosts seem not to present differentiated sex chromosomes and, even in species that show heteromorphic sex chromosomes, we can found an extreme diversity of sex chromosome systems (Oliveira *et al.* 2007). This variety is consequence of an extremely dynamic evolution process of the sex determination mechanisms and sex chromosomes, which is prone to create differences rather than uniformity (Schartl 2004). Moreover, genomic analysis of fish sex is also complicated by the fact that in several species environmental or even social factors can override genetic sex determination (Yamamoto 1969; Harry Briscoe & Williams 1992). Therefore, fish can provide excellent experimental systems for the identification of sex associated markers and for evolutionary analysis of sex chromosomes.

Furthermore, fish represent today one of the most important source of protein, especially considering the growing need for human food supply (James & Geoff 2001), and precise identification of the genetic bases of sex determination and differentiation can be a critical step for successful cultivation of several species (Klappert *et al.* 2007; Zhu & Gui 2007). Chromosome analyses can reveal the homogametic and the heterogametic sex, which could provide information about the sex determination mechanism of a species or group of

species. Unfortunately, it is difficult to distinguish between the sex chromosomes and the autosomes of several fish based on their shape and size, a peculiarity that could be mainly related to the early stage of evolution of the sex chromosomes, which implies that the differences between heteromorphic chromosomes are too small to be detected by current cytogenetic techniques (Yusuke *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). Nevertheless, in the last years, the development of molecular biology techniques has lead to the identification of male- or female-specific molecular markers that have been used for sex identification in different organisms, including fish species (Griffiths *et al.* 2000; Kovacs *et al.* 2001; Ferguson *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007).

The matrinchã, *Brycon cephalus* (Günther 1869), stands today as an extremely important freshwater fishery resource in the Amazonian region and is also considered one of the main cultivated fish species in Brazil due to its fast growth and omnivorous feeding (Werder & Saint-Paul 1978; Eckman 1984; Saint-Paul 1986; Bittencourt & Cox-Fernandes 1990). However, data on a Brazilian aquaculture program of the species have shown that successive hatchery generations led to an extremely different proportion between male and female births, as almost 92% of the individuals stand for male specimens in each generation (José Senhorini - CEPTA/IBAMA, personal communication).

Despite several cytogenetic analyses, no heteromorphic sex chromosomes have been found in *B. cephalus* (Margarido & Galetti 1996; Almeida Toledo *et al.* 1996; Margarido & Galetti 1999). Therefore, the goal of the present study was to identify sex associated DNA markers in this species - through the use of a random

amplified polymorphic (RAPD) assay and exploiting total DNA digestion by restriction enzymes - that could be used to establish a molecular method to distinguish gender in this species and provide data to better understand the mechanisms of sex chromosome evolution in teleosts fishes.

## **Material and Methods**

### **Sample collection and DNA extraction**

Individuals of *Brycon cephalus* Günther, 1860 (Characiformes: Characidae), from a captive stock of the species, were obtained from a national center of Tropical fish research (CEPTA/IBAMA - Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (municipality of Pirassununga, São Paulo State, Brazil). All animals of the farming stock had basically the same management, density stocking and feeding regimes - the average stocking density was 250g/m<sup>2</sup>, and the annual average temperature and dissolved oxygen was 26°C and 5.5ppm, respectively. DNA was achieved from sexually mature fish from caudal or anal fins using a TNES-urea-digestion buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0; 125mM NaCl; 10mM EDTA pH 8.0; 0.5%SDS; 4M urea) followed by a phenol-chloroform purification (Wasko *et al.* 2003) or obtained from liver using a phenol-chloroform protocol detailed in Sambrook and Russell (2001). The sex of the animals was determined by visual inspection of the dissected gonads under stereomicroscopy.

## **Screening of sex-specific markers**

### ***Restriction digestion dynamics***

Genomic DNA of one male and one female of *B. cephalus* was digested, separately, by 23 enzymes (*Accl*, *Alul*, *Apal*, *Asull*, *Aval*, *BamHI*, *BgII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *Hhal*, *HindIII*, *Hinfl*, *Msel*, *Mspl*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *SacI*, *XbaI*, *XmnI*, and *XhoI*). A digestion dynamics was performed for each enzyme using different cleavage times (1µg of DNA for 20 minutes, 1 hour and 4 hours, and 5µg of DNA for 14 hours).

### ***RAPD assay***

A set of sixty 10-mer RAPD oligonucleotides from OPP kit (Operon Technologies) and six oligonucleotides supplied by the Ready-To-Go RAPD Analysis Beads kit (GE Healthcare Life Sciences) were used as single primers to amplify DNA samples of *B. cephalus*, following the manufacturers' RAPD kit instructions. Pooled male and female DNA samples, each presenting equal amounts of genomic DNA of 10 individuals, were used, separately, in PCR, in order to minimize the identification of genetic variations not related to sex. Amplifications were done in duplicate and different analyses were performed with 50, 75, or 100 ng of target DNA, using a 25 µl reaction volume with 25pmol of single primer, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase. Amplification of multiple template DNA concentrations of every sample was carried out for all primers surveyed as a means of identifying artifactual variations. The following cycle program was carried out: a preheating denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 1 minute, 36°C for 1 minute, and 72°C for 2

minutes. A final extension step at 72°C for 10 minutes was also performed. A negative control, without template DNA, was also included to monitor any possible contamination of the reactions. Further amplifications were performed using individual DNA samples in order to assure the sex-specificity of some identified fragments, as described above.

#### ***Visualization of the restriction digested and PCR products***

Restriction digested (10 µl) and RAPD fragments (8 µl) were electrophoretic separated on 1.4% or 2% agarose gels, respectively, in TAE buffer (Tris-Acetic acid-EDTA). The digested DNA products were run for 2 hours and the RAPD fingerprints were run for 4.5-6.5 hours at 110V/150A. DNA bands were visualized using Ethidium Bromide staining (Sambrook & Russell 2001) or GelRed (Biotium) staining followed by UV illumination. Molecular weights were estimated using a standard DNA marker. Stratagene EagleSight version 3.22 image documentation system (Agilent Technologies Stratagene) was used to obtain digital images of the agarose gels and to identify the DNA fragments.

#### **Cloning, nucleotide sequencing and sequence analysis**

Potential RAPD sex-specific DNA fragments were excised from agarose gels using the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) and cloned using the pGEM-T plasmid (Promega), which was used to transform competent cells of *E. coli* DH5α strain (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Clones were sequenced on an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems) with DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Life Sciences), following the manufacturer's

instructions. Nucleic acid sequences were subjected to BLASTN and BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and the sequence alignment was performed using the computer program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

## **Sex-specificity certification**

### ***Dot blot hybridization***

Genomic DNA samples (100 ng) of 10 males and 10 females of *B. cephalus* were denaturized in boiling water for 10 minutes and quickly chilled on ice. The denatured DNA was blotted onto a nylon membrane (Hybond-N) (GE Healthcare Life Sciences) and fixed by baking at 80°C for 2 hours. The hybridization of the filter-immobilized DNA was performed using as probe a 535 bp fragment isolated from females of *B. cephalus*. Probe labelling, hybridization, and detection steps were performed with AlkPhos Direct Labeling and Detection System CDP-Star kit (GE Healthcare Life Sciences), according to the manufacturer's instructions. A quantitative analysis was done with the Scion Image computer program (<http://www.scioncorp.com>). in order to evaluate relative DNA hybridization signals.

### ***DNA amplification in B. cephalus and related species***

A pair of primers (F: 5'TACCTAGAGAATCTACAAGG3', R: 5' TGAATGTACCATGACTGTCTA3') was designed based on the consensus sequence of a 535 bp cloned fragment to test its reliability as a marker for the female gender in *B. cephalus*. Amplification reactions were performed using DNA samples of 10 individuals of each sex. Two DNA samples (1 male and 1 female)

of *B. orbignyanus* (CEPTA/IBAMA) and *B. lundii* (São Francisco River, municipality of Três Marias, Minas Gerais State, Brazil) were also used in PCR in order to verify the presence of the isolated DNA sequence in other species of the same gender. PCR amplifications were done simultaneously for all the DNA samples and were performed in 25 µl, containing 100 ng of genomic DNA, 0.3 µM of each primer, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase. The PCR procedure involved a preheating at 95°C for 2 minutes that was followed by 35 cycles at 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. A final extension step (72°C for 2 minutes) was also performed. A negative control, without template DNA, was also included to monitor PCR contamination. Amplification products were separated in 1.4% agarose gels running for 2 hours, as described above.

## **Results and Discussion**

Satellite DNAs represent a class of *tandem* repetitive DNA (Beridze 1986; Koehler *et al.* 1997) that is mainly located on the centromeric and telomeric regions and, occasionally, on interstitial portions of the chromosomes, and are usually found in heterochromatic regions (Stephan & Cho 1994). The Y chromosome, as the W in female heterogametic systems, is gene poor and contains a high proportion of repetitive DNA (Bull, 1983; Kondo *et al.* 2006). Thus, satellite DNAs have been identified in these sex chromosomes in several animal groups, including fish, revealing that these repetitive sequences are related to the differentiation of heteromorphic sex chromosomes (Nanda *et al.*



1990; Nakayama *et al.* 1994; Reed & Phillips 1995; Devlin *et al.* 1998; Vicente *et al.* 2003; Kondo *et al.* 2006). Therefore, as *B. cephalus* presents large heterochromatic blocks in few chromosomes of its karyotype (Margarido & Galetti 1999), we performed a restriction digestion of genomic DNA of males and females in order to identify satellite DNA sequences in the species that may be associated to a particular sex.

The performed digestion dynamics using 23 nucleases resulted in no differences between both sexes. As there is no previous description of differentiated sex chromosomes in *B. cephalus*, the failure in finding any sex-associated restriction band potentially related to a repetitive DNA seems to confirm the lack of chromosome differences between males and females. Or, alternatively, if present, the sex chromosomes of the species could be considered to be in a primitive state of differentiation.

RAPD markers stand for DNA fragments from PCR amplification of random segments of DNA using a single primer of arbitrary nucleotide sequence and does not require any specific prior knowledge of the genome of the target organism (Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990), an advantage that is crucial in genetic analysis of *B. cephalus* since its genome has not been well studied so far. The RAPD technology has been used in numerous studies, as the screening for sex-specific markers in several vertebrate species, as birds (Horng *et al.* 2005; Hinckley *et al.* 2005; Wu *et al.* 2007; Hsu *et al.* 2009), mammals (Horng *et al.* 2004), and fish (Iturra *et al.* 1997; Kovács *et al.* 2001; Wuertz *et al.* 2006; Keyvanshokoh *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). More recently, Xia *et al.*

(2010) identified a DNA segment in *Paramisgurnus dabryanus* that can be successfully used to distinguish gender in this fish species.

In the present study, sixty six random primers were used on pooled DNA samples of males and females in order to generate RAPD fingerprints to search for a sex-specific DNA sequence in *B. cephalus*. Most of the primers yielded 5 to 21 clear and reproducible bands (amplicon length 150-1.800 bp), with an average of 9.7 bands per individual and primer, and each of them generated a unique pattern of amplification products. Through the analysis of bulked DNA samples, 885 fragments were present in both sexes and 48 candidate bands, which were singular to males or females (Table 1), were further analyzed in different individuals of each sex, separately, to verify their individuality. Just one of the tested random primers - OPP-15 (GGAAGCCAAC) - permitted the identification of a valid sex-associated fragment with approximately 500 bp, as it produced a stable band in the DNA fingerprints of all tested females, but not males (Figure 1). The high rate of false positive results should be explained by the drawback of using short oligonucleotides as random primers in which the PCR low stringency can lead to non-reproducible results. Moreover, the successful application of RAPD in gender differences depends on the use of many primers as possible, as one random primer can scan only several thousand base pairs. Therefore, hundreds of primers should be necessary to detect tiny differences that exist between the male and female genomes. Kovacs *et al.* (2001) used more than 300 RAPD primers in order to identify two male specific DNA markers in the African catfish *Clarias gariepinus*.

Cloning and further sequencing and database analyses of the isolated fragment from the female genome of *B. cephalus* led to the identification of two distinct DNA segments, composed by 533 and 535 base pairs (Figure 2), named as Bc15.1 and Bc15.2, respectively.

The smaller fragment presented a 49.2% GC base content (Figure 2a). BLASTN and BLASTX analyses evidenced a 70% identity level of this DNA segment with several zebrafish (*Danio rerio*) non determined mRNA sequences (throughout a query coverage of 91%) and a 73% identity level (query coverage of 88%) with a *D. rerio* protein gene - phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W (PIGW) (accession number NM\_001114572.1). Besides, it also presented a similarity of 68% (53% query coverage) with a mRNA sequence from another fish species, *Oncorhynchus mykiss*, that represents an internal portion of the PIGW gene of *D. rerio*. High identities levels were also observed among the isolated fragment of *B. cephalus* and the PIGW gene described for several vertebrate species, as *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, and *Rattus norvegicus*. PIGW makes a protein that takes part in a series of steps that produces a molecule called GPI anchor that attaches many different proteins to the cell membrane (Takeda *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 1998). As this protein has an essential cellular role and since database searches at NCBI indicated that this gene is present in animals of both sexes, we presupposed that probably both males and females of *B. cephalus* present such DNA segment and the obtained results may possibly be a false positive. Thereby, this DNA fragment was not afterwards analyzed in the present study.

The Bc15.2 fragment isolated from *B. cephalus* females had a 38.7% GC content and an internal repetitive sequence (GAAGTCT) (Figure 2b). No significant similarity was observed with any known sequences in NCBI either in nucleotide or protein databases, and thus the isolated fragment can be considered a novel marker that could be gender-specific. Therefore, further experiments were performed in order to verify its sex-association in the species. Dot-blot hybridization analysis, using total DNA, resulted in strong hybridization signals in female individuals but not in males (Figure 3a), thus confirming the female-specificity of the isolated fragment. Quantitative analysis of the hybridization results evidenced a much higher signal (61.57%) in pooled DNA samples of females than the observed for pooled male's samples (11.83%) (Figure 3b). The low identified hybridization significance detected in males must be reflecting unspecific probe hybridization. Results were also cross checked with DNA controls to ensure a higher reliability (Figure 3).

Based on the nucleotide sequence of the Bc15.2 fragment, a primer set was designed to amplify an internal region of the candidate female-specific DNA segment in order to convert the RAPD marker into a sequence characterized amplified region (SCAR). PCR results evidenced a positive amplification for all tested female DNA samples as a fragment of approximately 250 bp was identified through agarose gel electrophoresis (Figure 4a). No DNA amplification product could be observed for any of the analyzed males (Figure 4b), which indicates a molecular diagnose of the animal's sexes with a 100% overall accuracy.

The identification of sex-specific sequences seems to be conditional to the operation of genetic sex determination mechanisms (Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth *et al.* 2005; Keyvanshokoo *et al.* 2007). Therefore, the obtained data on the designed SCAR marker can lead to the presupposition that females of the analyzed strain of *B. cephalus* could represent the heterogametic sex in this species. Similar data was observed for *Salminus brasiliensis*, a species that seems to present a close relationship with *Brycon* (Uj 1990; Lima 2001; Calcagnotto *et al.* 2005; Abe 2011), in which a dimorphic molecular marker was evidenced, indicating its female-specificity (Santos 2009). It is feasible that *B. cephalus* are in an early phase of sex chromosome differentiation in which sex chromosomes are similar in shape and only over time might acquire different morphology and become heteromorphic. However, as the present analyses were performed in individuals that belong to a single stock that had basically the same management, density stocking, and feeding regimes, further data should be obtained in order to verify the gender specificity of the characterized DNA marker in *B. cephalus* in general.

In addition, a larger screening of the presence/absence of this segment in males and females could indicate a better scenario of a putative sex chromosome evolution in *B. cephalus*. The eventual finding of the designed SCAR marker in some males of the species can also indicate that its presumed sex chromosomes are in a somewhat early stage of differentiation, since it is possible to occur an association between a specific DNA segment and repetitive DNA sequences found in heterochromatic regions that can aggregate together and thereby

promote the association of non-homologous chromosomes (Weiler & Wakimoto 1995). Although sex-determining genes should not recombine (Nei 1969), this can occur in very early stages of sex chromosome evolution. Cessation of recombination between large parts or all of the sex chromosomes is the ultimate cause of their differentiation (Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth *et al.* 2005). Therefore, the establishment of the absence or presence of the designed SCAR marker in males of *B. cephalus* should point to an elderly or to a more recently process of genetic sex differentiation in the species, respectively.

In order to verify the presence and the sex association of the characterized DNA marker in other species of the genus *Brycon*, the designed SCAR primers were also used in DNA samples of *B. orbignyanus* and *B. lundii*. No amplification results were found neither on females or males of these two species (Figure 4c). Therefore, although it is likely that the Bc15.2 DNA fragment isolated from *B. cephalus* does not exist in the genome of these other related species, the relative high stringency conditions of the PCR (a 55°C annealing temperature) could have resulted in no amplification products using heterologous primers. However, these data are consistent with observation of sex markers of other fish species that can vary among closely related species, a finding that can be related to the dynamic nature of the molecular evolution of sex associated markers (Iturra *et al.*, 1997; Chen *et al.* 2009). Besides, the number of sex-linked genes or markers found in fishes is low in comparison to other vertebrate groups, and most markers do not seem to be applicable to more than one fish species or even strain (Iturra *et al.*, 1997). Moreover, fish gender differences can be very

complex in some fish species and dependent not only on genetic but also on environmental or even social factors (Harry Briscoe & Williams 1992; Devlin & Nagahama 2002).

## **Conclusions**

The performed bulked segregant analysis (BSA) in *B. cephalus* through RAPD was used as a suitable strategy for the identification of a DNA marker since the use of DNA samples of different individuals bulked into one pool theoretically leads to screen the genome at multiple positions in every reaction. Therefore, two bulked pools of segregants differing by one trait will differ at the locus harboring that trait (Michelmore *et al.* 1991). Moreover, the fact that the studied individuals should be closely related (siblings) and presented a low level of genetic diversity (Wasko *et al.* 2004) may have contributed to the identification of a sex-marker even using a moderately reduced set of RAPD primers which probably screened a reduced proportion of the species genome. Higher genetic diversity among individuals could have lead to a failure in identifying such markers (Li *et al.* 2002; Keyvanshokoo *et al.* 2007). As a result, the RAPD technique proved to be an efficient strategy for screening for sex-specific DNA segments, as also reported for other fish (Iturra *et al.* 1997; Kováks *et al.* 2001; Felip *et al.* 2005; Jianjun *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010).

For several fish species, it is difficult to distinguish between the sex and the autosomal chromosomes based on their shape and/or other characteristics, mainly because the sex chromosomes can be in a primary state of evolution and

the differences between heteromorphic chromosomes are too small to be detected by current cytogenetic techniques (Yusuke *et al.* 2007), a characteristic that may occur in the analyzed strain of *Brycon cephalus*. Although the identity of sex-linked markers in *B. cephalus* is still elusive, future studies could reveal if the identified heteromorphism is also present in other strains of the species and a sex-specific chromosome region may be characterized and used to study mechanisms of chromosome evolution in this fish species.

Furthermore, there are several potential uses for sex specific DNA markers in applied and basic research. *In vivo* sampling could be performed at very early developmental stages to identify males and females and to estimate sex ratios (Kawakami & Hopkins 1996). In basic research, novel sex associated markers could serve as a starting point for the identification of genes involved in regulation of sex determination as well as in gonad differentiation. Besides, molecular identification of sex could be useful in testing possible environmental and chemical effects on fish reproduction, as already performed in salmonids (Nagler *et al.* 2001).

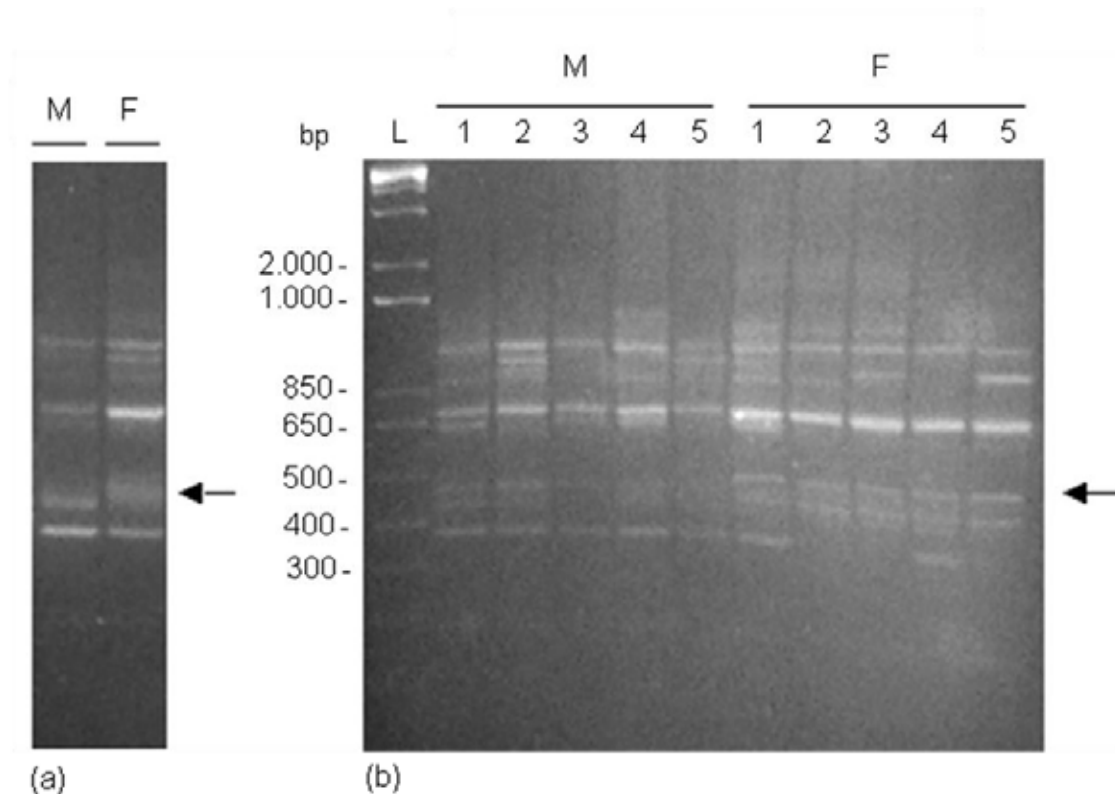
### **Acknowledgements**

The authors thank CEPTA/IBAMA for providing fish samples. This research was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). E.M.S. was supported by a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).



**Table 1:** Potential sex-specific DNA fragments identified in *Brycon cephalus* throughout a RAPD screening assay.

primer	Approximate sizes (base pairs) of potential sex-specific DNA fragments	
	Females	Males
OPP-13 (5'-GGAGTGCCTC-3')	600, 650, 680	-
OPP-15 (5'-GGAAGCCAAC-3')	500	-
OPP-17 (5'-TGACCCGCCT-3')	1.200, 800	-
OPP-19 (5'-GGGAAGGACA-3')	350	-
OPP-23 (5'-AGTCAGCCAC-3')	800	-
OPP-24 (5'-AATCGGGCTG-3')	-	800
OPP-27 (5'-GAAACGGGTG-3')	500, 650, 700, 1.000	850
OPP-29 (5'-GGGTAACGCC-3')	850	-
OPP-31 (5'-CAATCGCCGT-3')	-	1.600
OPP-35 (5'-TTCCGAACCC-3')	450, 700	-
OPP-37 (5'-GACCGCTTGT-3')	350, 550, 870	850
OPP-39 (5'-CAAACGTCCG-3')	220, 970, 980	180
OPP-40 (5'-GTTGCGATCC-3')	980, 1.000	-
OPP-41 (5'-TTCGAGCCAG-3')	550	-
OPP-42 (5'-GTGAGGCGTC-3')	-	220, 960, 980
OPP-45 (5'-GATGACCGCC-3')	670	-
OPP-46 (5'-GAACGGACTC-3')	1.500	-
OPP-47 (5'-GTCCCGACGA-3')	200, 350, 850	-
OPP-48 (5'-TGGACCGGTG-3')	-	500
OPP-49 (5'-CTCACCGTCC-3')	350	-
OPP-51 (5'-AAAGCTGCGG-3')	550, 650	350
OPP-54 (5'-TGCGTGCTTG-3')	750	1.500
OPP-55 (5'-GACGGATCAG-3')	-	1.400
OPP-56 (5'-CACACTCCAG-3')	500	1.000
OPP-57 (5'-TTCCCCCAG-3')	350	-



**Figure 1:** RAPD fingerprints of *Brycon cephalus* with the random primer OPP-15 (GGAAGCCAAC). The arrows evidence a candidate sex-specific band found in females. (a) pooled DNA samples of 10 males and 10 females; (b) individual DNA samples (1-5) of males and females. M, males; F, females; L, 1Kb plus DNA ladder (bp, base pairs) (Invitrogen).

(a)

GGAAGCCAACAGAGAGGGAATATTCTCGGTGGTGGGTTACGTCGCCGCTACATGGCCGGAGTTCAGGTTG  
GCCTTTATCTGATGCGGACGAGAACTTTGGTCAAAGACTGGATATTGGTGGTCAGGAACCTTCTGTTGGGA  
AGCTTCGGGCTATGGCTCGTGTATACGTCTGCCAGGCGTACGTTGAGCCAGTTTCGCGCCGTATGGCCAA  
CCTGTCGTTCTGCATATGGACTGTGGCCAGTCCTTGTTTTCTCTCGTGCTTGAGCACCGCCGACGTCG  
TATTGCTTTTTGCCAAAGTGGTGTCAAATTTCTCCCTTGTGTCAACCTCCTGGAATCCAGCTGGGAGTTCG  
CCGACAGATGGAAAATTAAGGAAGAAAATGGACGAGTTGTGTCTCGTTCAGTCTGTGAACAGGAATCAGCT  
GTTGTTTTCTGCTTGCAAATCTGATGACTGGTTTAACCATCATACTTGTGGGACACTCTGAAAAGTAAC  
GACTTCTTTGCCCGTTTACATAATCTGCAACATTAC 533pb

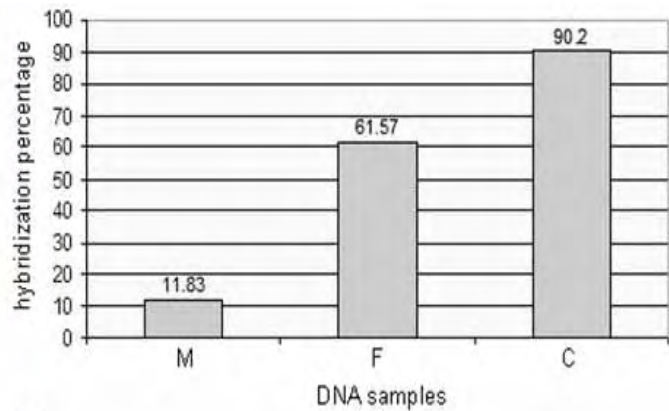
(b)

GGAAGCCAACGAAACCCAGTACCTAGAGAATCTACAAGGATCTGTGACCGAAAAGATCCTTCGTAGCCTG  
GCCTAGTTTATTTAATCCAAATGTAGACAAATGTGCATTGTTTAAAGATTAAACACAAATGTTAATCACA  
CAAGTGTGGAAAATTCTTGTGCTTAAAGAGGAATTTCACTGAATGCAATGGTTAAAGCAACACTATGTAGC  
ATTTTTACCTTAACTAACAGCCAAAATTAACAGGATGCATCACTGACTTGTAAGGCAGAATAGCACTT  
CTATCATAGCTACTACAGGCTCCTCACGCTGCTAACTGCACTATGTGACTTTGGTGAAGCGGGCAGGAAGT  
CTGAAGTCTGAAGTCTGTGTACAGGAAAAGATTTAATAAAAAAATTAAGTATCATGATGCAGAGAAGCAGA  
AATGTGGTGTCCACATATGAGGACACAGGGTTTTGAAAGGGGAAAAGGTCAGGATTAAGTGTAGGGTCACA  
TTCAATAGACAGTCATGGTACATTCACCCTTTAGAATT 535pb

**Figure 2:** Consensus nucleotide sequences of two DNA fragments isolated from females of *Brycon cephalus* using the RAPD primer OPP-15. (a) a fragment of 533 bp; (b) a fragment of 535 bp evidencing an internal repetitive sequence (underline).

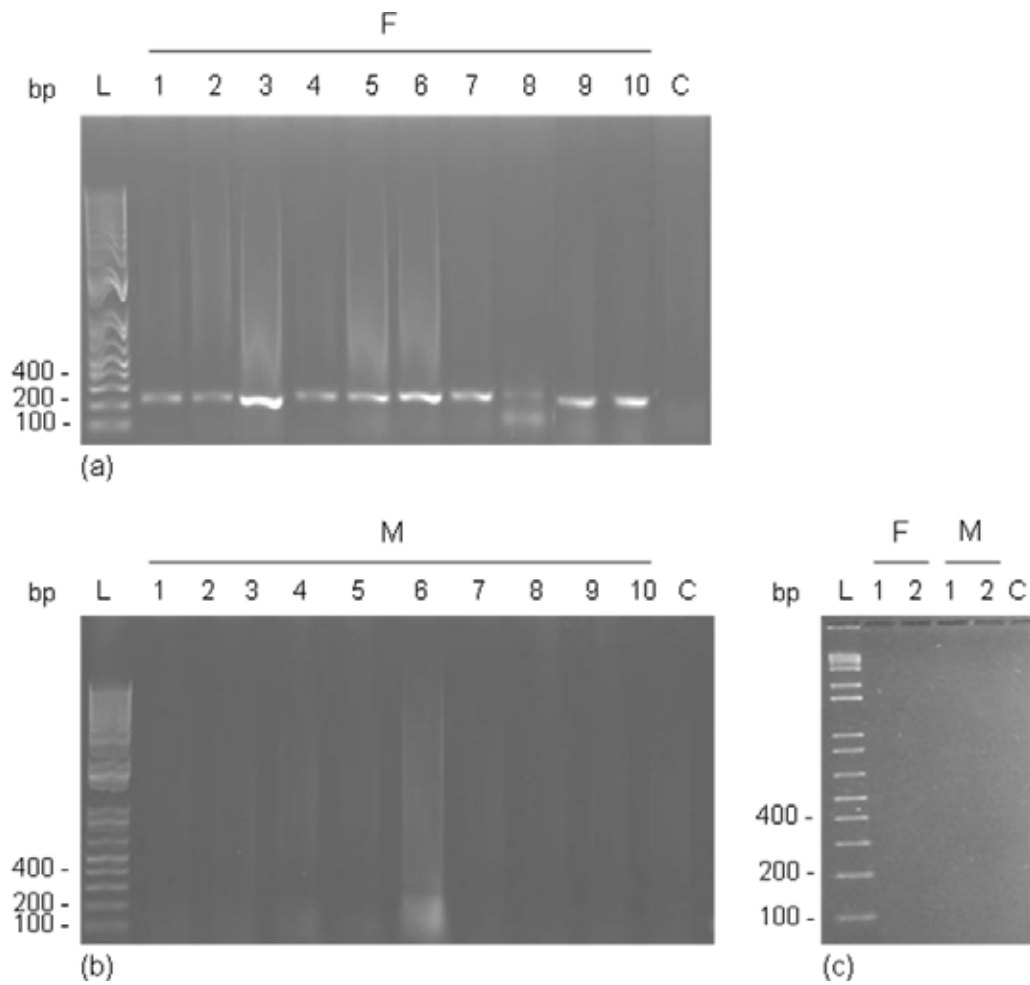


(a)



(b)

**Figure 3:** (a) Dot blotting of genomic DNA samples of *Brycon cephalus* using a 535 bp fragment isolated from females of the species as a probe. Strong hybridization signals can be seen in female DNA samples. 1 to 10, individual DNA samples of males; 11 to 20, individual DNA samples of females; (b) quantitative analysis of hybridization results; M, pooled DNA samples of males; F, pooled DNA samples of females; C, positive control (probe x probe).



**Figure 4:** Sequence characterized amplified region (SCAR) related to a female-specific DNA fragment isolated from *Brycon cephalus*. (a) *B. cephalus* individual DNA samples (1-10) of females; (b) *B. cephalus* individual DNA samples (1-10) of males; (c) individual DNA samples of *Brycon orbignyanus* (1) and *Brycon lundii* (2). F, females; M, males; C, negative control; L, 1Kb plus DNA ladder (bp, base pairs) (Invitrogen).

## **4.2 CAPÍTULO 2**

**Isolation and characterization of satellite DNA repeats in species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae)**

## **Isolation and characterization of satellite DNA repeats in species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae)**

Running Title: Satellite DNA in *Brycon*

### **Abstract**

Bryconinae stands for a fish group with several species that have been reported in South and Central America hydrographic systems. Chromosome analyses based on classical cytogenetic techniques have revealed that, although all species so far studied present 50 chromosomes with large heterochromatic blocks, the heterochromatin distribution pattern seems to be species-specific. In order to improve genetic data on the species, the purpose of the present study was to isolate and characterize satellite DNA repeats in *Brycon cephalus* and *B. orbignyanus*. Isolation of these repetitive DNA segments was performed throughout DNA restriction digestion. Genomic DNA digestion of *B. cephalus* using *EcoRV*, *EcoRI*, *NotI*, *XbaI* and *XhoI* led to the identification of fragments of approximately 250-300 bp in agarose gels that were denominated SatBc1, SatBc2, SatBc3, SatBc4 and SatBc5, respectively. Only the *HindIII* enzyme permitted the visualization of digested DNA fragments in *B. orbignyanus* - two restriction bands of around 650 and 850 bp (named as SatBo1 and SatBo2) were identified throughout agarose gel electrophoresis. Cloning and sequence analysis of the SatBc1 fragment evidenced a monomeric unit constituted of 255 bp and 52.9% AT rich. Although preliminary, the obtained data suggest that different DNA satellite families are present in the genomes of *Brycon* species. Further data on the isolated repetitive DNAs can have an enormous potential to improve our understanding on the dynamics of repetitive DNA classes and also to give new information about the karyotype differentiation and evolution of the Bryconinae group.

Key words: *Brycon cephalus*, *Brycon orbignyanus*, enzyme digestion, tandem arrays

## Introduction

An important portion of the eukaryotic genome is represented by different repetitive DNA classes that can be either dispersed in the genome or even organized in *tandem* arrays (Charlesworth *et al.* 1994; Koehler *et al.* 1997). One of the *tandem* repetitive DNA classes is represented by the satellite DNAs, whose monomeric units are commonly located on centromeric and telomeric regions or, occasionally, on interstitial portions of the chromosomes, which generally correspond to heterochromatic regions. Therefore, these repetitive units have important implications in chromosome structure and function (Tyler-Smith & Willard 1993; Stephan & Cho 1994).

Moreover, considering the variable evolutionary dynamics of satellite DNA sequences, they can provide valuable information for both microevolution studies, as in the case of species-specific or chromosome-specific satellites (Ugarkovic & Plohl 2002), as well as phylogenetic inferences, in which satellite DNAs can be shared by some species of a given group (Pons *et al.* 2002; Pons & Gillespie 2003; Kantek *et al.* 2009). Nevertheless, satellite DNA families can also remain conserved over time, maintained by low mutation rates which reflect in the homogenization of the sequences (De La Herrán *et al.* 2001).

Satellite DNAs have been investigated in different fish species as cytogenetic markers (Saito *et al.* 2007), to understand phylogenetic relations (De La Herrán *et al.* 2001; Saito *et al.* 2007), clarify cytotaxonomy in species complexes (Mantovani *et al.* 2004; Vicari *et al.* 2008; Kantek *et al.* 2009), determine the origin of supernumerary chromosomes (Jesus *et al.* 2003; Ziegler



*et al.* 2003; Artoni *et al.* 2006), or identify and characterize sex chromosomes (Devlin *et al.* 2001; Parise-Maltempi *et al.* 2007).

The Bryconinae subfamily is composed by 43 valid species, including 41 species of the genus *Brycon*, one species of *Hemochilus* and one species of *Chilobrycon* (Lima 2003). Fishes of the genus *Brycon* have been reported for all main hydrographic Brazilian systems, representing important fishery resource and/or hatchery stocks in some areas (Bittencourt & Cox-Fernandes 1990; Pereira Filho 1994). Therefore, as part of an ongoing effort to genetically characterize the species of this group and to check for relationships among them, the present study intent to isolate and characterize satellite DNAs in *B. cephalus* and *B. orbignyanus*.

## **Material and Methods**

### **Sample collection, DNA extraction and chromosomal preparation**

The analyzed specimens of *Brycon cephalus* Günther, 1860 and *B. orbignyanus* Valenciennes, 1849 were obtained from captive stocks from a national center of Tropical fish research (CEPTA/IBAMA - Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (municipality of Pirassununga, São Paulo State, Brazil). DNA was extracted from liver using a phenol-chloroform protocol detailed in Sambrook and Russell (2001). Mitotic chromosomes were obtained according to the technique described by Bertollo *et al.* (1978).

## **Restriction digestion**

Genomic DNA samples of *B. cephalus* were digested, separately, by the enzymes *AccI*, *AluI*, *ApaI*, *AsuI*, *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindIII*, *HinfI*, *MseI*, *MspI*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *SacI*, *XbaI*, *XmnI*, and *XhoI*. The restriction enzymes *HindIII*, *EcoRI*, *BglII*, *KpnI*, and *XhoI* were applied in *B. orbignyana*. A digestion dynamics was made for each enzyme using different cleavage times (1 U/μg of DNA for 20 minutes, 1 hour and 4 hours, and 5 U/μg of DNA for 14 hours). Restriction digested samples (10 μl) were electrophoretic separated on 1.4% agarose gels in TAE buffer (Tris-Acetic acid-EDTA), during 2 hours at 110V/150A. DNA bands were visualized using Ethidium Bromide staining (Sambrook & Russell 2001) or GelRed (Biotium) staining followed by UV illumination. Molecular weights were estimated using a standard DNA marker. Stratagene EagleSight version 3.22 image documentation system (Agilent Technologies Stratagene) was used to obtain digital images of the agarose gels and to identify the DNA fragments.

## **Cloning, nucleotide sequencing and sequence analysis**

DNA fragments were cloned using the pMOS plasmid (kit pMOS Blue, GE Healthcare Life Sciences), which was used to transform competent cells of *E. coli* DH5α strain (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Clones were sequenced on an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems) with DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Life Sciences), following the manufacturer's instructions. Nucleic acid sequences were subjected to BLASTN (Altschul *et al.*,

1990) searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and the sequence alignment was performed using the computer program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). DNA sequences were also analyzed using Gene Runner, version 3.03 program (Hasting Software, Inc.) and Seqool version 2.0 program (Magnus Wang).

## **Results and Discussion**

Satellite DNA has been extensively studied in several vertebrates. However, few sequences have been isolated and characterized in fish, especially considering the great number of species of this vertebrate group. Therefore, in order to contribute to the understanding of the dynamics and evolution of this class of repetitive DNA, DNA samples of *Brycon cephalus* and *B. orbignyanus* were subjected to restriction digestion in order to search for satellite DNA to be further investigated. Total digestion of the genomic DNA of *B. cephalus* using the enzymes *EcoRV*, *EcoRI*, *NotI*, *XbaI* and *XhoI* led to the identification of fragments of approximately 250-300 bp in agarose gels (Figure 1a). Only the *HindIII* enzyme permitted the visualization of digested DNA fragments in *B. orbignyanus* - two restriction bands of around 650 and 850 bp were identified through agarose gel electrophoresis (Figure 1b).

Although these preliminary results do not permit to attest the satellite nature of the isolated DNA fragments, the isolation of repetitive DNA through genomic restriction stands for the most traditional methodology in order to identify satellite repeats in a wide range of species (Vicari *et al.* 2010). The

digestion of a satellite DNA by a nuclease that recognizes a restriction site in the repetitive unit generates nearly identical or identical fragments due to the cleavage in regularly spaced sites (Lewin 2001). The results evidenced in Figure 1c confirm the presence of multimer bands of the repetitive units, obtained in partial *EcoRI* and *EcoRV* DNA digestions of *B. cephalus*, originating a ladder pattern that is typical of tandem repetitive DNA arrays.

Moreover, *Brycon* species are characterized by several large blocks of heterochromatin, mainly found at centromeric and interstitial chromosome regions (Margarido & Galetti 1996; Almeida-Toledo *et al.* 1996; Margarido & Galetti 1999). As heterochromatin is generally associated to satellite repeats (Franck *et al.* 1991; Tyler-Smith & Willard 1993; Stephan & Cho 1994), it seems plausible that *Brycon* species should present distinct classes of satellite DNAs. Likewise, although all species of this genus so far studied present very similar karyotypes composed by 50 chromosomes, each species has an unique heterochromatin distribution, a feature that can be used in order to discriminate them (Margarido & Galetti 1996; Almeida-Toledo *et al.* 1996; Margarido & Galetti 1999), which could also indicate that singular classes of repetitive DNAs could be found for each species.

Despite the relative similarity in size, the fragments generated by different enzymes in *B. cephalus* could represent different satellite DNA classes. These fragments were denominated as SatBc1 (*EcoRV*), SatBc2 (*EcoRI*), SatBc3 (*NotI*), SatBc4 (*XbaI*) and SatBc5 (*XhoI*). The 650 and 850bp fragments identified in *B. orbignyanus* through a *HindIII* digestion assay should also represent two

different repetitive DNA classes and were called, respectively, SatBo1 and SatBo2.

After cloning the SatBc1 fragment, four recombinant clones were selected for further analyses. Alignment of the isolated clones showed a sequence identity of 98%. The consensus nucleotide sequence of this satellite monomer is shown in Figure 2. No relevant similarity was found with any previously described nucleotide sequence. The SatBc1 monomers, composed of a monomeric unit constituted of 255 bp, are 52.9% AT rich. As commonly found in repetitive DNA, some repeated elements and several palindromic sequences (internal inverted repeats at positions 51, 54 59, 61, 76, 180, 184, 229, 245, 249) were observed within the monomer unit (Figure 2). Palindromic sequences have the potential to form a secondary stem-loop structure and, although they can be a potential source of genetic instability, they are also important DNA motifs involved in the regulation of different cellular processes (Lisnic *et al.* 2005).

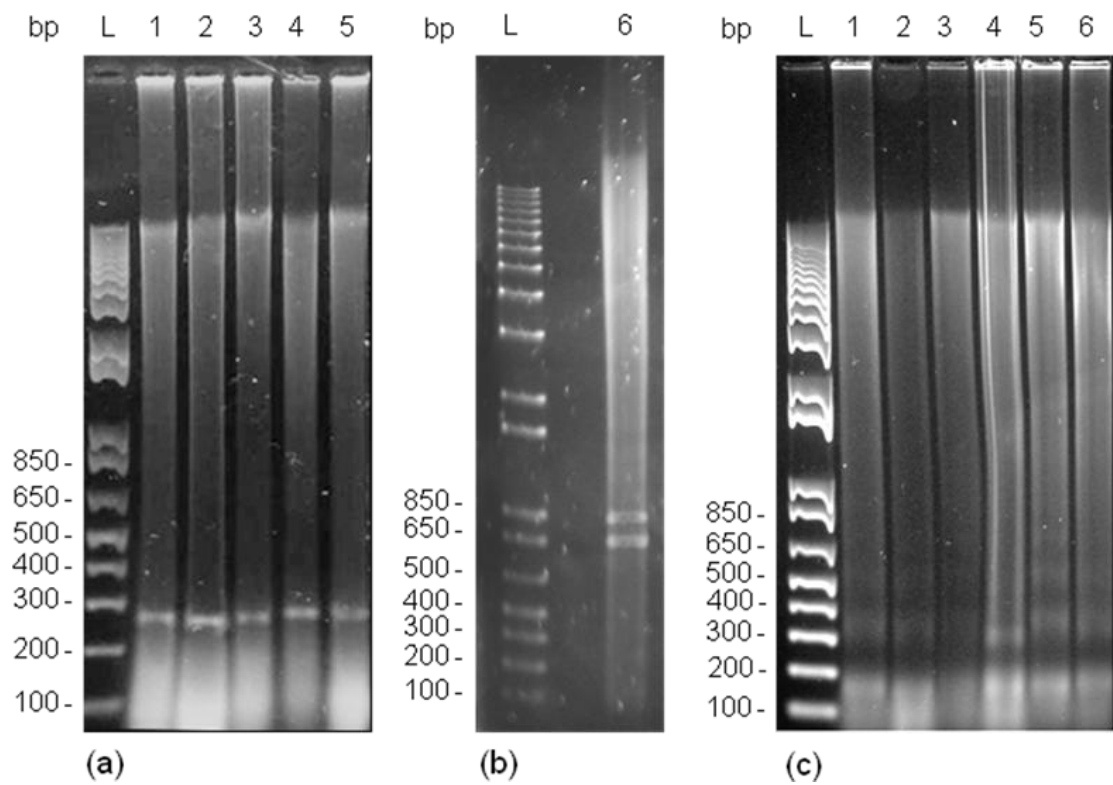
Future analyses will be done in order to better characterize the isolated satellite DNAs of *B. cephalus* and *B. orbignyanus*. These analyses should include nucleotide sequencing and Southern blot/membrane hybridization, in order to define their genome organization, and also *in situ* hybridization procedures, in order to localize these segments in metaphase chromosomes of the species. Chromosome preparations were already obtained (Figure 3) in order to perform FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) analyses using the satellite DNA clones as probes. The finding of a diploid number of 50 chromosomes for *B.*

*cephalus* and *B. orbignyanus* (Figure 3) corroborate previous data for both species (Margarido & Galetti 1996; Almeida-Toledo *et al.* 1996).

Recent advances in molecular biology permitted the use of different molecular markers that have been used in order to infer on species relationships. Despite the use of different mitochondrial or nuclear DNA markers in phylogenetic analyses the genus *Brycon*, there are still several discrepancies on the species relationships (Hildsdorf *et al.* 2008; Antunes *et al.* 2010; Abe 2011). Therefore, although preliminary, data on satellite DNA in a diverse fish group like Bryconinae can have an enormous potential to improve our understanding on the dynamics and evolution of this repetitive DNA class and also to give new information about the karyotype differentiation and evolution of this Neotropical group and also in vertebrates in general.

### **Acknowledgements**

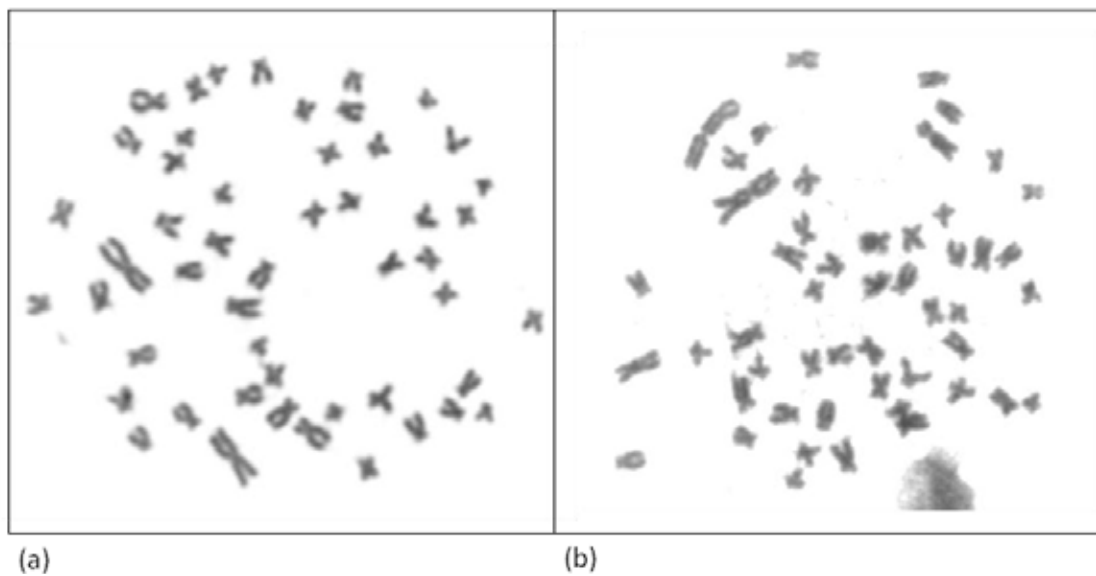
The authors are grateful to CEPTA/IBAMA for providing fish samples. This research was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). E.M.S. was supported by a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).



**Figure 1:** DNA restriction digestion display of *Brycon cephalus* (a, c) and *Brycon orbignyianus* (b) evidenced in agarose gels. Total DNA digestion (14 hours enzyme treatment) performed with the restriction enzymes *EcoRV* (1), *EcoRI* (2), *NotI* (3), *XbaI* (4), *XhoI* (5) and *HindIII* (6) (a, b). Partial DNA digestion (20 min, 1 hour and 4 hours enzyme treatment) performed with the restriction enzymes *EcoRI* (1, 2 and 3) and *EcoRV* (4, 5 and 6) (c). L, 1Kb plus DNA ladder (bp, base pairs) (Invitrogen).

GATTGGCTCCAAACCCCCCCCCCCCCCAGGTTCTTTTCGTGACATTGTCTCATTAATTGGATCGATGTTTA  
TTTGGATATGGAGTCTGTCATCTCCACTAAGACCTGCTCTTTCCCCTCGCTGCTCTCCTCTCTGTTTTATT  
GCCTCCCTGTTGTCTACCAGGTGAGAACTTTCCATCAAGGCCAATTTGGGTGACTGAACCATCGCTTCAGT  
CTCCAGAAAATGA GACTGCATAGAGCGAGATGAATTTTAATC 255bp

**Figure 2:** Consensus nucleotide sequence of a DNA fragment (SatBc1) isolated from *Brycon cephalus* throughout total DNA digestion with *EcoRV*. Internal perfect and imperfect repeats are underlined.



**Figure 3:** Metaphase chromosomes of *Brycon orbignyanus* (a) and *Brycon cephalus* (b).



## 5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho:

1) Um fragmento isolado de *Brycon cephalus*, através da metodologia de RAPD, corresponde a um novo marcador de DNA e possui caráter sexo-específico, associado a fêmeas da espécie de uma linhagem de cultivo. Os dados apontam para a provável presença de cromossomos sexuais heteromórficos ainda em fase inicial de diferenciação na espécie.

2) Diferentes repetições de DNA satélite possivelmente ocorrem no genoma de *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyanus*. Os dados podem ser utilizados em estudos futuros de caracterização genética destas espécies e em análises evolutivas neste grupo de peixes.

3) A ocorrência de diferentes marcadores associados ao sexo e diferentes segmentos de DNA repetitivo em distintas espécies do gênero *Brycon* pode ser relacionada à natureza dinâmica da evolução molecular de tais marcadores, levando ao acúmulo e fixação de diferenças entre espécies.

Dada a importância de estudos genéticos em espécies do gênero *Brycon* e, de uma forma geral, em peixes teleosteos, já que este constitui um grupo extremamente diversificado entre os vertebrados, os resultados obtidos podem ser considerados de grande potencial para melhor compreensão da dinâmica e evolução de marcadores de DNA associados ao sexo e de repetições de DNA satélite. A continuidade das análises genéticas no gênero *Brycon* mostra-se

extremamente promissora, tanto para a caracterização de distintas espécies como para utilização dos dados em interpretações evolutivas e como subsídios para aplicações futuras em estudos básicos e aplicados.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K.T. (2011) Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Minte-Vera, C.V., Winemiller, K.O. (2000) Biodiversity in the high Paraná river floodplain. *In: Gopal, B., Junk, W.J., Davis, J.A. (eds.). Biodiversity in Wetlands: assessment, function and conservation.* Leiden, Backhuys. 89-118.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3<sup>rd</sup> ed., Garland Publishing, Inc, New York and London.
- Ali, B.A., Huang, T.H., Qin D.N., Wang X.M. (2004) A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14: 443-453.
- Almeida-Toledo, L.F., Bigoni, A.P., Bernardino, G., Foresti, F., Toledo-Filho, S.A. (1996) Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia* 49: 35-43.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Andrade-Talmelli, E.F., Kavamoto, E.T., Narahara, M.Y., Fenerich-Verani, N. (2002) Induced spawning of “piabanha” (*Brycon insignis*) in captivity. *Brazilian Journal of Animal Science* 31: 803-811.
- Antunes, R.S.P., Gomes, V.N., Prioli, S.M.P., Prioli, R.A., Júlio, H.F., Prioli, L.M., Agostinho, C.S., Prioli, A.J. (2010) Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genetic and Molecular Research* 19: 674-684.
- Appleyard, S.A., Mather, P.B. (2000) Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research* 31: 435-447.
- Araneda, C., Lam, N., Diaz, N.F. (2009) Identification, development, and characterization of three molecular markers associated to spawning date in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 296: 21-26.

- Artoni, R.F., Vicari, M.R., Endler, 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 chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277–284.
- Azevedo, P. (1972) A piscicultura, histórico, considerações gerais e perspectivas futuras. In: Branco, S.M. *Poluição e piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, USP pp. 177-180.
- Banack, S.A., Horn, M.H., Gawlicka, A. (2002) Disperser- vs. establishment-limited distribution of a riparian fig tree (*Ficus insipida*) in a Costa Rican tropical rain forest. *Biotropica* 34: 232-243.
- Bardacki, F., Skibinski, D.O. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: Species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117–123.
- Barman, H.K., Barat, A., Yadav, B.M. (2003) Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* 217: 115–23.
- Barrero, N.M.L., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N. (2006) Genetic diversity in piracanjuba populations OF *Brycon orbignyanus* with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Animal Science* 84: 170-170.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M. (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiaie) using microsatellites *Aquaculture* 247: 51-65.
- Basavaraju, Y., Prasad, DT., Rani, K. (2007) Genetic diversity in common carp stocks assayed by random-amplified polymorphic DNA markers. *Aquaculture Research* 38: 147-155.
- Belmont, R.A.F. (1994) Considerações sobre a propagação artificial da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* - CESP. I *Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon* 17-18.
- Bercsenyi, M., Magyary, I., Urbanyi, B., Orban, L., Horvath, L. (1998) Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome* 41: 573-579.
- Beridze, T.G. (1986) *Satellite DNA*. Springer-Verlag (Berlin and New York).
- Bernardino, G., Senhorini, J.A., Bock, C.L. (1993) Propagação artificial do matrinchã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae). *Boletim Técnico do CEPTA* 6: 1-9.

- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S., Moreira-Filho, O. (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1: 103-120.
- Bielawski, J.P., Pumo, D.E. (1997) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* 78: 32-40.
- Bittencourt, M.M., Cox-Fernandes, C. (1990) Peixes migradores sustentam pesca comercial. *Ciência Hoje* 11: 20-24.
- Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezatto, L.E. (2003) Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Resources* 16: 362-369.
- Borghetti, J.R., Canzi, C., Nogueira, V.G. (1991) A influência da proteína no crescimento do matrinxã (*Brycon orbignyanus*) criado em tanques-rede. *Revista Brasileira de Biologia* 5: 695-699.
- Borowsky, R., McClelland, M., Cheng, R., Welsh, J. (1995) Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 12: 1022 -1032.
- Braga, R.A. (1982) Depleção aparente do matrinxã, *Brycon hilarii*, em pesqueiros do Rio São Francisco. Brasil. *Boletim Técnico DNOCS* 40: 175-180.
- Brahmane, M.P., Mitra, K., Mishra, S.S. (2008) RAPD fingerprinting of the ornamental fish *Badis badis* (Hamilton 1822) and *Dario dario* (Kullander and Britz 2002) (Perciformes, Badidae) from West Bengal, India. *Genetics and Molecular Biology* 31: 789-792.
- Britski, H.A. (1972) Peixes de água doce do Estado de São Paulo - Sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto Nacional de Pesca, São Paulo, pp.79-108.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S. (1988) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. 3ª ed. Ministério da Irrigação - CODEVASF. Minas Gerais. 115p.
- Bulazel, K., Metcalfe, C., Ferreri, G.C., Yu, J.W., Eldridge, M.D.B., O'Neill, R.J. (2006) Cytogenetic and molecular evaluation of centromere-associated DNA sequences from a marsupial (Macropodidae: *Macropus rufogriseus*) X chromosome. *Genetics* 172: 1129-1137.

- Bull, J.J. (1983) *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin Cummings (eds.), Menlo Park, CA.
- Caccone A., Allegrucci, G., Fortunato, C., Sbordoni, V. (1997) Genetic differentiation within the european sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *Journal of Heredity* 88: 316-324.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 135-153.
- Callejas, C., Ochando, M. D. (1998) Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology* 53: 208-215.
- Callejas, C., Ochando, M.D. (2002) Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 89: 36-43.
- Capriglione, T., Morescalchi, A., Olmo, E., Rocco, L., Stingo, V., Manzo, S. (1994) Satellite DNAs, heterochromatin and sex-chromosomes in *Chinodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). *Polar Biology* 14: 285-290.
- Carneiro, P., Urbinati, E. (2001) Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. *Journal of Applied Aquaculture* 11: 1-13.
- Castagnolli, N. (1992) *Criação de peixes de água doce*. FUNEP. Jaboticabal. 189p.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P. (1990) *Mooenjichthys* Miranda-Ribeiro Pisces:Osthariophysi:Characidae), a phylogenetic reappraisal and redescription. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 103: 525-542.
- Ceccarelli, O.S., Senhorini, J.A. (1996) *Brycon* - viabilização da produção de alevinos. *Panorama da Aqüicultura* 35: 10-11.
- Ceccarelli, O.S., Volpato, G.L. (2001) Efeitos da densidade e proporção de presas consorciadas no crescimento e sobrevivência de larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Boletim Técnico do CEPTA* 14: 1-18.
- Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. (2002) ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 54: 139-150.

- Cestari, A.N. (1973) Métodos de estudos dos cromossomos de vertebrados. In: Azevedo J.L., de Costa, S.O.P. (eds.). *In: Exercícios Práticos de Genética*. Companhia Editora Nacional. Ed. Universidade de São Paulo.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D. (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philosophy and Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 355: 1563-1572.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., Marais, G. (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118-128.
- Chauhan, T., Rajiv, K. (2010) Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1: 281-291.
- Chelomina, G.N., Rozhkov, K.V., Ivanov, S.A. (2008) Discrimination of interspecific hybrids in natural populations of Amur sturgeon fish by means of multilocus RAPD-PCR markers. *Cytology and Genetics* 42: 342-350.
- Chen, H., Leibenguth, F. (1995) Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers, and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochemistry and Genetics* 3: 297-306.
- Chen, S., Li, J., Deng, S.P., Tian, Y.S., Wang, Q.Y., Zhuang, Z.M., Sha, Z.X., Xu, J.R. (2007) Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology* 9: 273-280.
- Chen, J.J., Wang, Y.L., Yue, Y.Y., Xia, X.H., Du, Q.Y., Chang, Z.J.A. (2009) novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular Cellular Probes* 23: 235-239.
- Chen, J.J., Du, Q.Y., Yue, Y.Y., Dang, B.J., Chang, Z.J. (2010) Screening and identification of male-specific DNA fragments in common carps *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization *Journal of Fish Biology* 77: 403-413.
- Corley-Smith, G.E., Lim, C.J., Brandhorst, B.P. (1996) Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* 142: 1265-1276.
- Conte, L., Bozano, G.L.N., Ferraz, L.J. (1995) Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba *Brycon orbignyanus* em gaiolas. *Boletim Técnico do CEPTA* 8: 49-59.

- Das P., Prasad, H., Meher, P.K. (2005) Evaluation of genetic relationship among six *Labeo* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research* 36: 564-569.
- De la Herrán, R., Ruiz, Rejon, C., Ruiz Rejon, M., Garrido-Ramos, M.A. (2001) The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity* 87: 691-697.
- Degani, G. (2004) Application of RAPD and cytochrome b sequences to the study of genetic variations in F1 and F2 generations of two different strains of guppy (*Poecilia reticulata*, Peter 1854). *Aquaculture Research* 35: 807-815.
- Devlin, R.H., Stone, G.W., Smailus, D.E. (1998) Extensive direct tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y chromosome of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Molecular Evolution* 46: 277-287.
- Devlin, R.H., Biagi, C.A., Smailus, D. E. (2001) Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111: 43-58.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y. (2002) Sex determination and differentiation in fish. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Dibartolomeis, S.M., Tartof, K.D., Jackson, F.R. (1992) A superfamily of *Drosophila*-satellite related (SR) repeats restricted to the X-chromosome euchromatin. *Nucleic Acids Research* 20: 113-1116.
- Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L. (1993) RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fisher. *Zoological Science* 10: 849-854.
- Driedzic, W.R., de Almeida-Val, V.M.F. (1996) Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *Journal of Experimental Zoology* 274: 327-333.
- Eckmann, R. (1984) Induced reproduction in *Brycon* cf. *erythropterus*. *Aquaculture* 38: 379-382.
- Egozcue, J. (1971) *Técnicas em citogenética*. Ed. ESPAXS, Barcelona, 144 pp.
- Elo, K., Ivanoff, S., Jukka, A., Vuorinen, J.A., Piironen, J. (1997) Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 152: 55-65.
- Epplen, J.F., Epplen-Haupt, A. (2002) Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. *In: Some aspects of chromosome structure*



- and function*. Sobti R.C., Obe G., Athwal R.S. (eds.), Narosa Publishing House, New Delhi. pp. 1-10.
- Eschmeyer, W., Fricke, R., Fong, J.D., Polack, D.A. (2010) Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). *Zootaxa* 2525: 19-50.
- Eschmeyer, W.N., Fong, J.D. (2010) Species of fishes by family/subfamily. On-line version <http://research.calacademt.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>. dated 14/02/2011.
- Exadactylos, A., Geffen, A.J., Panagiotaki, P., Thorpe, J.P. (2003) Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Marine Ecology* 246: 253-264.
- Faria, C.A. (1994) Propagação artificial de piabanha (*Brycon insignis*) na seção de hidrobiologia e aquicultura de Paraibuna-CESP. I Seminário Sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon*. p.09-15.
- Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., Zanuy, S. (2005) Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Experimental Zoology* 290: 384-395.
- Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodohl, P.A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C. (2006) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* 47: 103-126.
- Figueiredo-Garutti, M.L., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R.H.S., Moraes, G., Gutierrez, J., Vicentini-Paulino, M.L.M. (2002) Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* 132: 467-476.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981) Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, London.
- Foresti, F., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F. (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Fontana, C.S., Bencke, G.A., Reis, R.E. (2002) Projeto Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT-PUCRS) e Edipocrs.
- Fosse, P.J. (1998) Engorda do matrinxã (*Brycon cephalus*) com inclusão de feno de alfafa em rações: crescimento, pigmentação e rendimentos. Dissertação de

Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

Franck, J.P.C., Harris, A.S., Bentzen, P.B., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M. (1991) Organization and evolution of satellite, minisatellite and microsatellite DNAs in teleosts fishes. *In: Oxford Surveys on Eukaryotic Genes*. Maclean, N. (eds.), 7nd. edition. Oxford University Press, Oxford, pp. 51-82.

Frasca-Scorvo, C.M., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B. (2001) Comportamento alimentar do matrinhã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Boletim do Instituto de Pesca* 27: 1-5.

Gasper, J., Shiina, T., Inoko, H., Edwards, S.V. (2001) Songbird genomics: analysis of 45-kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in Red-winged Blackbird (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75: 26-34.

Géry, J. (1977) *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Neptune City, 672p.

Géry, J., Mahnert, V. (1992) Notes sur quelques *Brycon* des bassins de l'Amazonie, du Parana-Paraguay et du Sud-Est brésilien (Pisces, Characiformes, Characidae). *Revue Suisse Zoologie* 4: 793-819.

Ghosh, D., Alam, M.S. (2008) Genetic variation and divergence in two critically endangered mahseer species *Tor tor* and *Tor putitora* (Pisces: Cypriniformes) assessed by RAPD markers. *Genes and Genomics* 30: 215-222.

Godoy, M.P. (1975) *Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da Bacia do Rio Mogi Guassú*. Piracicaba, Editora Franciscana.

Gomes, L.C., Baldisserotto, B., Senhorini, J A. (2000) Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of the matrinhã *Brycon cephalus* (Characidae) in ponds. *Aquaculture* 183: 73-81.

Goulding, M.W. (1980) *The fishes and the forest: exploration in Amazonian natural history*. University of California Press, Los Angeles. 280p.

Graef, E.W., Resende, E.K., Petry, P. (1986) Crescimento do matrinhã (*Brycon cephalus*) e jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) em pequenas represas. *IV Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*. p.26.

Graef, E.W., Resende, E.K., Petry, P., Stori Filho, A. (1987) Policultivo de matrinhã (*Brycon* sp.) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp.) em pequenas represas. *Acta Amazônica* 16/17: 33-42.

- Grattapaglia, D., Sederoff, R. (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137
- Griffiths, R., Orr, K.J., Adam, A., Barber, I. (2000) DNA sex identification in the threespined stickleback. *Journal of Fish Biology* 57: 1331-1334.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P., Sambrook, J. (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* 39: 439-446.
- Harris, H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London B* 164: 298-310.
- Harry, J.L., Briscoe, D.A., Williams, K.L. (1992) Putting the heat on sex determination. *Genetica* 87: 1-6.
- Hilsdorf, A.W.S., Azeredo-Espin, A.M.L., Krieger, M.H., Krieger, J.E. (2002) Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture* 214: 81-91.
- Hilsdorf, A.W.S., Oliveira, C., Lima, F.C.T., Matsumoto, C.K. (2008) A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. *Genetics and Molecular Biology* 31: 366-371.
- Hinckley, J.D., Park, R.L., Xiong, S., Andersen, W.R., Kooyman, D.L. (2005) Identification and Development of Sex Specific DNA Markers in the Ostrich Using Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Poultry Science* 4: 663-669.
- Honczaryk, A. (1994) Efeito da densidade de estocagem sobre a performance do matrinhã, *Brycon cephalus* Gunter, 1869 (Teleostei; Characidae). *Anais do Simpósio Brasileiro de Aquicultura/III Encontro Brasileiro de Patologia de Organismos Aquáticos*. Piracicaba. p.15.
- Horn, M.H. (1997) Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rica tropical rain forest. *Oecologia* 109: 259-264.
- Horng, Y.M., Chen, Y.T., Wu, C.P., Jea, Y.S., Huang, M.C. (2004) Cloning of Taiwan water buffalo male-specific DNA sequence for sexing. *Theriogenology* 62: 1536-43.

- Horng, Y.M., Hsin, Y.L., Wu, C.P., Lin, C.Y., Huang, M.C. (2005) Identification of animal-derived materials in ruminant feeds by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Journal of Agriculture and Association* 6: 54-63.
- Howes, G. (1982) *Review of the genus Brycon (Teleostei: Characoidei)*. Bulletin Brithist Museum. Natural History (Zoology).
- Hsu, H.A., Wang, P.H., Chao, M.C., Chan, F.T., Wang, L.M., Lin, P.I., Chang, C. H., Yuan, H.W., Ding, S.T. (2009) Use of random amplified polymorphic DNA to identify several novel markers for sex identification in the crested serpent eagle and crested goshawk. *Theriogenology* 72: 755-764.
- Iturra, P., Medrano, J.F., Bagley, M., Lam, N., Vergara, N., Marin, J.C. (1997) Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101: 209-213.
- Ivanov, S.V., Modi, W.S. (1996) Molecular characterization of the complex sex-chromosomes heterochromatin in the rodent *Microtus chrotorrhinus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 75: 49-56.
- James, H.T., Geoff, L.A. (2001). Fish as food: aquaculture's contribution Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Reports* 2: 958-963.
- Jesus, C.M., Galetti, 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 species with B chromosomes. *Genetics* 118: 25-32.
- Jianjun, C., Wang, Y., Yue, Y., Xia, X., Du, Q., Chang, Z. (2009) A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Probes* 23: 235-239.
- John, B. (1988) The biology of heterochromatin. *In: Heterochromatin*. Verma, R.S. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge.
- Johnson, S.L., Midson, C.N., Ballenger, E.W., Postlethwait, J.H. (1994) Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish. *Genomics* 19: 152-156.
- Kantek, D.L.Z., Vicari, M.R., Peres, W.A.M., Cestari, M., Artoni, R.F., Bertollo, L. A.C., Moreira-Filho, O. (2009) Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). *Journal of Fish Biology* 75: 408-421.

- Kawakami, K., Hopkins, N. (1996) Rapid identification of transgenic zebrafish. *Trends in Genetics* 12: 9-10.
- Kazianis, S.D.C., Morizot, B.B., Mcentire, R.S., Borowsky, R.L. (1996) Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP- PCR/RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups. *Genome Research* 6: 280-289.
- Keyvanshokooh, S., Pourkazemi, M., Kalbassi, M.R. (2007) The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology* 23: 1-2.
- Klappert, K., Butlin, R.K., Reinhold, K. (2007) The attractiveness fragment-AFLP analysis of local adaptation and sexual selection in a caeliferan grasshopper, *Chorthippus biguttulus*. *Naturwissenschaften* 94: 667-674.
- Koehler, M.R.T., Haaf, M., Guttenbach, M., Schmid M. (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Chromosome Research* 5: 325-331.
- Koh, T.L., Khoo, G., Fan, L.Q., Phang, V.P.E. (1999) Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of discus (*Symphysodon* ssp.) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture* 173: 485-497.
- Kondo, M., Hornung, U., Nanda, I. (2006) Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka. *Genome Research* 16: 815-826.
- Kovács, B., Egedi, S., Bártfai, R., Orbán, L. (2001) Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110: 267-276.
- Krzywinski, J., Sangare, D., Besansky, N. J. (2005) Satellite DNA from the Y chromosome of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Genetics* 169: 185-196.
- Leitão, M.A.S., Affonso, E.G., Silva, M.F.E., Meirelles, N.C., Rantin, F.T., Vercesi, A.E., Junqueira, V.C.B., Degterev, I.A. (2000) The liver monooxygenase system of Brazilian freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126: 29-38.
- Lewin, B. (2001) *Genes VII*. Editora Artmed, Porto Alegre.

- Lewontin, R.C., Hubby, J.L. (1966) A molecular approach the study of genic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Li, W. H. (1997) *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Li, Y.C., Cheng, Y.M., Hsieh, L.J., Ryder, O.A., Yang, F., Liao, S.J., Hsiao, K.M., Tsai, F.J.C.H., Lin, C.C. (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y-chromosome. *Chromosoma* 114: 28-38.
- Lima, F.C.T., (2001) Revisão taxonômica do gênero *Brycon* Muller e Troschel, 1844, dos rios da América do Sul Cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- 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: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. (eds.), Edipucrs, Porto Alegre: pp. 106-169.
- Lisnic, B., Svetec, I-K, Saric, H., Nikoloc, I., Zgaga, Z. (2005) Palindrome content of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Current Genetics* 47: 289-297.
- Lins, L.V., Machado, A.B.M., Costa, C.M.R., Herrmann, G. (1997) *Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lohe, A.R., Hilliker A.J., Roberts, P.A. (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134: 1149-1174.
- Lohe, A.R., Hilliker, A. J. (1995) Return of the H-word (heterochromatin). *Current Opinion in Genetics* 5: 746-755.

- Lopera-Barrero, N.M. (2007) Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R. Sirol, R. (2008) Genetic characterization of *Brycon orbignyanus* stocks used in restocking programs. *Medicina Veterinária de Córdoba* 13: 1110-1119.
- Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Sirol, R.N. (2010) Genetic characterization of *Brycon orbignyanus* using the semi-natural system. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62: 184-191.
- Lopez, D.D., Palacio, G.V., Cortes, T.R. (2008) Cytogenetic characterization of the neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Biología Tropical* 56: 1619-1628.
- Macaranas, J.M., Mather, P.B., Toebe P. (1995) Assessment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers. *Marine Freshwater Research* 46: 217-228.
- Machado, A.B.M. (1998) *Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Maltagliati, F., Domecini, P., Fosch, F.F., Cossu, P., Casu, M., Castelli, A. (2003) Small-scale morphological and genetic differentiation in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a coastal brackish-water pond and an adjacent pool in northern Sardinia. *Oceanologica Acta* 26: 111-119.
- Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A., Moreira-Filho, O. (2004) Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 536-542.
- Maria, N.A. (2008) Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de Piratininga *Brycon natterii* (Gunther, 1864). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Margarido, V.P., Galetti, P.M. (1996) Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios* 85: 219-228.
- Margarido, V.P., Galetti 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.

- Martinez-Ibarra, J.A., Guillen, Y., Arredondo-Jimenez, J.J., Rodriguez-Lopez, M. H. (2002) Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in Southern México. *Bio Control* 47: 481-486.
- Matsuda, M., Kusama, T., Oshiro, T., Kurihara, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (1997) Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genes Genetics Systematics* 72: 263-268.
- Matsumoto, C., K., Hilsdorf, A.W.S. (2009) Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology* 7: 395-402.
- Melo, J.S.C., Pereira, J. (1999) Efeito da densidade de estocagem e da aeração no crescimento de matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869). *Boletim Técnico do CEPTA* 12: 33-38.
- Mendonça, J.O.J., Melo, J.S.C. (1994) Introdução. In: *I Seminário sobre criação de espécies do gênero Brycon*. CEPTA, Pirassununga, SP, p. 1.
- Mendonça, J.O.J., Senhorini, J., Fontes, N.A., Cantelmo, A.O. (1994) Influência da fonte protéica no crescimento do matrinxã, *Brycon cephalus*, em viveiros. *Boletim Técnico do CEPTA* 6: 51-58.
- Mendonça, J.O.J. (1994) Criação de espécies do gênero *Brycon*. In: *I Seminário sobre criação de espécies do gênero Brycon*. CEPTA, Pirassununga, SP, p. 31-48.
- Mestriner, C.A., Galetti, P.M., Valentini, S.R., Ruiz, I.R.G., Abel, L.D.S., Moreira-Filho O., Camacho, J.P.M. (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9.
- Michelmore, R.W., Para, I., Kasser, R.V. (1991). *Proceedings of Natural Academy of Science, USA*, 88: 9828-9832.
- Miklos, G.L.G. (1985) Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. MacIntyre, R.J. (ed.), Plenum, New York.
- Mirande, J.M. (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8: 385-568.



- Moreira, A.B., Visentainer, J.V., Souza, N.E., Matsushita, M. (2001) Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 565-574.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology* 55: 335-350.
- Nadig, S.G., Lee, K.L., Adams, S.M. (1998) Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. *Aquatic Toxicology* 43: 163-178.
- Nagler, J.J., Bouma, J., Thorgaard, G.H., Dauble, D.D. (2001) High incidence of a male-specific genetic marker in phenotypic female chinook salmon from the Columbia River. *Environmental Health Perspective* 109: 67-69.
- Nakayama, I., Foresti, F., Tewari, R., Schartl M., Chourrout, D. (1994) Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probe in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103: 31-39.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schröder, J.H., Zischler, H., Epplen, J.T. (1990) Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *Journal of Molecular Evolution* 30: 456-462.
- Narahara, M.Y., Kavamoto, E.T., Godinho, H.M. (1994) Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, no Instituto de Pesca. In: I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*. CEPTA, Pirassununga, SP, p. 5-6.
- Narahara, M.Y., Andrade-Talmelli, E.F., Kavamoto, E.T., Godinho, H.N. (2002) Reprodução induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1070-1075.
- Navajas-Perez, R., Schwarzacher, T., de la Herran, R., Rejon, C.R., Rejon, M.R., Garrido-Ramos M.A. (2006) The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives. *Gene* 368: 61-71.
- Nei, M. (1969) Linkage modification and sex difference in recombination. *Genetics* 63: 681-699.
- Nelson, L.S. (1994) *Fishes of the world*. 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York, NY, US.
- Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the world*, 4<sup>th</sup> ed., Wiley New York, NY, US.

- Nesbo, C.L., Fossheim, T., Vollestad, L.A., Jakobsen, S. (1999) Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology* 8: 1387-1404.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. (2007) Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish cytogenetics*. Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kappor, B.G. (eds.), Science Publisher, Enfield, NH, USA.
- Partis, L., Wells, R.J. (1996) Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10: 435-441.
- Parise-Maltempi, P.P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetics and Genome Research* 116: 218-223
- Pereira Filho, M. (1994) Estudos desenvolvidos no INPA (Manaus-Amazonas) com o matrinhã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*. CEPTA, Pirassununga, SP, p.25-30.
- Pezzato, L.E., Barros, M.M., Carratore, C.R. (1994) Avaliação do matrinhã (*Brycon cephalus*) mantido sob condições de clima tropical. VIII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. p. 62.
- Plomion, C., O'Malley, D.M., Durel, C.E. (1995) Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*) Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1028-1034.
- Pons, J., Petitpierre, E., Juan, C. (2002) Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera) *Molecular Biology and Evolution* 19: 1329-1340.
- Pons, J., Gillespie, R.G. (2003) Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. *Gene* 313: 169-177.
- Portugal, L.P.S. (1990) Revisão sistemática do gênero *Triportheus* Cope (Teleostei, Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Porto, J.I.R., Feldberg, E., Nakayama, C.M., Falcão, J. (1992) A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Revista de Hydrobiologia Tropical* 25: 287-299.

- Postlethwait, J., Johnson, S., Midson, C. N., Talbot, W.S., Gates, M., Ballenger, E.W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J.S., Horne, S., Kimmel, C. B., Hutchinson, M., Johnson, M., Rodriguez, A. (1994) A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* 264: 699-703.
- Rahman, S.M.Z., Khan, M.R., Islam, S. ( 2009) Genetic variation of wild and hatchery populations of the catla Indian major carp (*Catla catla* Hamilton 1822: Cypriniformes, Cyprinidae) revealed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 32: 197-201.
- Rajyashri, K.R., Singh, L. (1995) A BKM-associated human Y-chromosomal DNA is conserved and transcribed in the testis of mouse. *Chromosoma* 104: 274-281.
- Reed, K.M., Phillips, R.B. (1995) Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma* 104: 242-251.
- Rodriguez-Rodriguez, M.D., Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P. (2010) Genetic diversity of piracanjuba used in stock enhancement programs with microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 56-63.
- Romagosa, E., Ayroza, L.M.S., Sanches, E.G. (1994) Informes preliminares sobre a reprodução induzida do matrinchã, *Brycon cephalus*. *Simpósio Brasileiro de Pesquisas em Medicina Veterinária* 1. pp.111.
- Rosa, R.S., Menezes, N.A. (1996) Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 647-667.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols*. Krawetz, S. Misener, S. (eds.). pp. 365-386.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Shcarf, S.J., Higuchi, G., Horn, F.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saini, A., Dua, A., Mohindra, V. (2010) Genetic Variability Analysis of Giant River Cattish (*Sperata seenghala*) Populations from Indus River System by RAPD-PCR. *Russian Journal of Genetics* 46: 982-987.
- Saint-Paul, U., Werder, U. (1977) Aspectos generales sobre la piscicultura en Amazonas y resultados preliminares de experimentos de alimentacion con raciones peletizadas con diferentes composiciones. *Simposio de la Asociacion Latinoamericana de Acuicultura*. p.1-21.

- Saint-Paul, U. (1986) Potential for aquaculture of South America: a review. *Aquaculture* 54: 205-240.
- Saito, Y., Rizalita, R.E., Abe, S. (2007) Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. *Genetica* 131: 157-166.
- Sallum, W.B. (1988) Cultivo do matrinhã (*Brycon lundii* Reinhardt, 1874) em gaiolas na represa de Três Marias. *VI Encontro Anual de Aqüicultura*. p.13.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santamaria, F.M., Antunes, A.S. (1999) Coloração e rendimento do filé de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), (Pisces, Characidae) silvestre e criada em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca* 25: 27-30.
- Santis, H.P., Chacon, L.A, Echavarria, A.E. (2007) Characterization of the genetic diversity of the fish *Brycon henni* (Characiformes:Characidae) in central Colombia with RAPD markers. *Revista de Biologia Tropical* 55: 1025-1035.
- Santos, A.F., Feldberg, E., Bertollo, L.A.C. (1985) Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica; *Brycon* sp. (Bryconinae, Characidae). *XIII Congresso Brasileiro de Zoologia*. p.173.
- Santos, L.V.R. (2009) Identificação e caracterização de marcadores genéticos dimórficos entre fêmeas e machos de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1836) (Pisces, Characiformes), Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Godinho, H.P. (1997) Reprodução induzida do matrinhã (*Brycon lundii*) Reinhardt, 1877, da bacia do Rio São Francisco. *Seminário Regional de Ecologia* 8: 353-354.
- Schartl, M. (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Current Opinion on Genetics and Development* 14: 634-641.
- Seixas, J.T., Oliveira, M.G.D., Donzele, J.L., Gomide, A.T.D., Menin, E. (1999) Amylase activity in the chyme of three Teleostei freshwater fish. *Brazilian Journal of Animal Science* 28: 907-913.
- Seixas, J.T., Oliveira, M.G.D., Donzele, J.L., Gomide, A.T.D., Menin, E. (2000) Trypsin activity in the chyme of three tropical teleost freshwater fish. *Brazilian Journal of Animal Science* 29: 2172-2180.

- Seixas, J.T., Fonseca, C.C., Oliveira, M.G.D, Donzele, J.L., Menin, E. (2001) Analysis of the diffuse endocrine system in the intestines of three freshwater Teleostei (Pisces) with different feeding habits. *Brazilian Journal of Animal Science* 30: 1403-1408.
- Singh, L., Purdom, I.F., Jones, K.W. (1980) Sex-chromosome associated satellite DNA - evolution and conservation. *Chromosoma* 79: 137-157.
- Singh, D. (1995). Female judgement of male attractiveness and desirability for relationships: Role of waist-to-bin ratio. *Journal of Personality and Social Psychology* 69: 1089-1101.
- Shikano, T., Taniguchi, N. (2002) Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. *Aquaculture* 204: 271-281.
- Sok-Keng, T., Hwei-Jan, H., Bon-chu, C. (2010) Zebrafish monosex population reveals female dominance in sex determination and earliest events of gonad differentiation. *Developmental Biology* 344: 849-856.
- Stephan, W., Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136: 333-341.
- Subramanian, S., Mishra, R.K., Singh, L. (2003) Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681-685
- Sultmann, H., Mayer, W.E., Figueroa, F., Tichy, H. (1995) Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA. *Molecular Biology and Evolution* 12: 1033-1047.
- Suzuki, T., Kobayashi, T., Ueno, K. (2008) Genetic identification of larvae and juveniles reveals the difference in the spawning site among Cyprininae fish species/subspecies in Lake Biwa. *Environmental Biology of Fishes* 82: 353-364.
- Sumner, A. T. (1990) *Chromosome Banding*. Unwin Hyman Inc, Londres, UK.
- Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Lida Y, Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., Kinoshita, T. (1999) Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73: 703-11.
- Tyler-Smith, C., Willard, H.F. (1993) Mammalian chromosome structure. *Current Opinion in Genetics* 3: 390-397.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) Clustal W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tundisi, J.G. (2003) *Água no século XXI: enfrentando a escassez*. RiMa/IIIE. São Carlos, SP.
- Ugarkovic, D., Plohl, M. (2002) Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO Journal* 21: 5955-5959.
- Uj, A. (1990) Etude comparative de l'osteologie cranienne dos poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F. (2001) Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *Journal of Aquaculture Tropical* 16: 75-85.
- Vermuln, H., Giamas, M.T.D., Campos, E.C., Câmara, J.J.C., Barbieri, G. (2002a) *Levantamento da pesca profissional continental no Estado de São Paulo, de 1994 a 2000. Dados preliminares*. I. Bacia do Rio Paraná. Série Relatórios Técnicos - Instituto de Pesca. São Paulo. No. 08. 11p.
- Vermuln, H., Giamas, M.T.D., Campos, E.C., Câmara, J.J.C., Barbieri, G. (2002b) *Levantamento da pesca profissional continental no Estado de São Paulo, de 1994 b 2000. Dados preliminares*. III. Bacia do Rio Paranapanema. Série Relatórios Técnicos - Instituto de Pesca. São Paulo. No. 10. 11p.
- Vicari, M.R., Moreira-Filho, O., Artoni, R.F., Bertollo, L.A.C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetic and Genome Research* 114: 163-168.
- Vicari, M.R., Artoni, R.F., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134: 311-317.
- Vicari, M.R., Nogaroto, V., Noletto, R.B., Cestari, M.M., Cioffi, M.B., Almeida, M. C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C., Artoni, R.F. (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives *Journal of Fish Biology* 76: 1094-1116.
- Vicente, E.V., Bertollo, L.A.C., Valentini, S.R., Moreira-Filho, O. (2003) Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. *Genetica* 119: 115-120.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A. Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2000) Mapping 18S ribosomal gene in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology* 23: 135-138.
- Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J.M., Galetti, P.M. (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44: 893-902.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2002) RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* 474: 131-137.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. (2003) Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161-165.
- Wasko, A.P., Galetti, P.M. (2003) PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 109-113.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A., Foresti, F. (2004) Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 48-52.
- Watanabe, R., Inoue, N., Westfall, B., Taron, C.H., Orlean, P. Takeda, J., Kinoshita, T. (1998) The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *EMBO Journal* 17: 877-85.
- Weiler, K.S., Wakimoto, B.T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annual Review on Genetics* 29: 577-605.
- Weitzman, S.H. (1960) Further notes on the relationships and classification of the South American characid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. *Stanford Ichthyology Bulletin* 7: 217-239.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Werder, U., Saint-Paul, U. (1978) Feeding trials with herbivorous and omnivorous Amazonian fishes. *Aquaculture* 15: 175-177.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Williams, D.J.S., Kazianis, Walter, R.B. (1998) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Transactions of American Fish Society* 127: 825–32
- Wilson, R.W., Wood, C.M., Gonzalez, R.J, Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A., Val, A. L. (1999) Ion and acid-base balance in three species of Amazonian fish during gradual acidification of extremely soft water. *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 277-285.
- Wohr, G., Fink, T., Assum, G. (1996) A Palindromic Structure in the Pericentromeric Region of Various Human Chromosomes. *Genome Research* 6: 267-279.
- Woynarovich, E., Horváth, L. (1983) *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. Manual de Extensão. FAO/CODEVASF/CNPq. Brasília. 220p.
- Woynarovich, E., Sato, J. (1990) Special rearing of larvae and post-larvae of matrinchã (*Brycon lundii*) and dourado (*Salminus brasiliensis*). In: Harvey B & Carolsfeld J (Eds.). *Workshop on larval rearing of finfish*. CIDA/CASAFA/ICSU, Pirassununga, p. 134-136.
- Wu, C.P., Horng, Y.M., Wang, R.T., Yang, K.T., Huang, M.C. (2007) A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology* 67: 328-333.
- Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Gongiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca, J.P. (2006) Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258: 685-688.
- Xia, X., Zhao, J., Du, Q., Zhi, J., Chang, Z. ( 2010) Cloning and identification of a female-specific DNA marker in *Paramisgurnus dabryanus*. *Fish Physiology Biochemistry* 42: 1-7.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation, in *Fish Physiology*. Hoar, W.S., Randall, A.B. (eds.), Academic Press. New York, U.S.A. pp. 117-172.
- Yan, J.P., Liu, S.J., Sun, Y.D. (2005) RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) x common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 243: 49-60.



- Yoon, J.M., Park, H.Y. (2002) Genetic similarity in the cultured and wild Crucian carp (*Carassius carassius*) estimated with random amplified polymorphic DNA. *Asian-Australasian Journal Animal Science* 15: 470-476.
- You, F., Wang, W., Xu, D.D. (2009) Hybrids between olive flounder *Paralichthys olivaceus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*: karyotype, allozyme and RAPD analyses. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27: 317-323.
- Yusuke, T., Kiyoshi, N., Satoshi, H., Mitsuru, S. (2007) Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma* 116: 463-70.
- Zanata, A.M. (2000) Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Zaniboni, E.F. (1985) *Biologia da reprodução do inatrilchii, Brycon cephalus* (Güntler 1869) (Teleostei: Characidae). Dissertação de Mestrado. INPA/FUA.
- Zhou, X., Faktor, O., Applebaum S.W., Coll, M. (2005) Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. *Heredity* 85: 251-256.
- Zhou, X., Coll, M., Applebaum, M., S.W. (2000a) Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: implications for life history traits. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 30: 863-868.
- Zhou, X., Applebaum, S.W., Coll, M. (2000b) Overwintering and migration in the cotton ballworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Israel. *Environmental Entomology* 29: 1289-1294.
- Zhu, H.P., Gui, J.F. (2007) Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture* 265: 109-117.
- Ziegler, C.G., Lamtsch, 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 Research* 11: 23-35.