

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Maressa Ferreira Neto

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS E EVOLUÇÃO
CARITOTÍPICA EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI,
CHARACIFORMES, CHARACIDAE).**

Tese de Doutorado

Botucatu, SP
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS E EVOLUÇÃO
CARITOTÍPICA EM *Astyanax fasciatus* (TELEOSTEI,
CHARACIFORMES, CHARACIDAE).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências
de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor.

Maressa Ferreira Neto
Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

"Se queres assumir em pleno o teu trabalho, não te esqueças de que toda a vocação
só se consegue concretizar com muita dedicação."
(Georges Bernanos)

Dedico

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sempre me apoiaram, financiaram e incentivaram, vibrando a cada conquista e sempre acreditando em minha capacidade. Aos meus irmãos que de alguma forma sempre participaram de minhas conquistas.

Aos professores Fausto Foresti, Orlando Moreira-Filho e Claudio de Oliveira, pela oportunidade e pelo apoio, pelo ensinamento diário e pela amizade. Aos professores Roberto Ferreira Artoni e Marcelo Ricardo Vicari, por toda colaboração e amizade, que desde o início de minha formação estiveram presentes, confiando em meu trabalho e ajudando para meu crescimento.

Ao professor Juan Pedro Camacho e sua equipe, e seu braço direito Mohammed Bakkali, que me receberam em seu laboratório na Espanha, e proporcionaram a melhor experiência de minha vida, onde aprendi coisas importantíssimas e fundamentais para a conclusão de minha tese e minha formação profissional e pessoal.

Ao técnico Renato Devidé, pela ajuda com as coletas, por tornar os nossos dias mais divertidos com suas piadas e seu bom humor e por estar sempre à disposição.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado com uma palavra de incentivo e elogio.

À minha amiga Rosangela, quem me ensinou além de técnicas e teorias, lições de vida e de caráter, que levarei comigo sempre. Foi fundamental. Ao meu amigo Wellington, quem me ensinou a dar os primeiros passos.

Ao meu namorado Pedro, que sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida, me apoiando e me ajudando, me esperando e até mesmo indo a coletas nos finais de semana, sempre paciente e parceiro, amigo e acima de tudo meu amor.

“Para aqueles que acreditam, nenhuma prova é necessária, para os que não creem, nenhuma prova é possível.”
(Stuart Chase)

Abstract

In this study, specimens of *Astyanax fasciatus* were collected at Água da Madalena stream (Botucatu, São Paulo, Brazil) and analyzed cytogenetically, revealing different diploid numbers of individuals living in sympatry and syntopy with chromosome numbers of 46, 48 and 50 chromosomes, still being identified a chromosome B accessory on all copies bearing the karyotype formula with 46 chromosomes. The specimens of this species analyzed were submitted to cytogenetic techniques basic of Giemsa staining, C-banding and Silver nitrate impregnation and molecular cytogenetic techniques, marked by base-specific fluorochromes, fluorescence in situ hybridization with probes 18S rDNA and 5S As51, telomeric probe (TTAGGG)_n and also with the chromosome microdissection, resulting in fluorescence in situ hybridization (FISH) using probes generated from chromosome B. The nucleolus organizer regions (NOR) and sites of 5S and 18S rDNA showed a distribution conserved between cytotypes $2n = 46$ and $2n = 48$ chromosomes, and the cytotype of $2n = 50$ chromosomes presented differently with respect to 18S rDNA sites, which are located on different chromosomes presented. The distribution of heterochromatin was somewhat variable among the three cytotypes and NOR region proved CG rich when subjected to treatment with chromomycin A3. The results obtained with the markers and molecular cytogenetics basic showed that appears not to occur intercrosses involving specimens of different cytotypes since it was not found among these formulas chromosomal hybrid cytotypes to the present. However, if these cytotypes share a number of homologies, as evidenced in the analysis of chromosomal markers are also differences that could be a consequence of chromosomal rearrangements complementary, providing new locations of rDNA sites and causing a consequent differentiation and speciation among copies of different cytotypes. The B chromosomes show no homology with the chromosome complement of A, suggesting a possible independent evolution for these chromosomes in the species. These studies will provide information regarding the structuring of genetic material present on chromosome B, and subsídeos for understanding the processes involved in chromosome differentiation in *Astyanax fasciatus*.

Resumo

Neste estudo, espécimens de *Astyanax fasciatus* capturados no ribeirão Água de Madalena (bacia do alto rio Paraná) foram analisados citogeneticamente, revelando diferentes números diplóides em indivíduos convivendo em simpatria e sintopia, com números cromossômicos de 46, 48 e 50 cromossomos, sendo identificado ainda um cromossomo B acessório em todos os exemplares portadores da fórmula cariotípica com 46 cromossomos. Os exemplares analisados desta espécie foram submetidos às técnicas citogenéticas básicas de coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação por nitrato de Prata e técnicas de citogenética molecular, com marcação por fluorocromos base-específicos, hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S, 5S e As51, com sondas teloméricas (TTAGGG)_n e também com a microdissecção cromossômica, que resultou da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas produzidas a partir dos cromossomos B. A região organizadora de nucléolo (NOR) e os sítios de rDNA 18S e 5S mostraram uma distribuição conservada entre os citótipos 2n=46 e 2n=48 cromossomos, sendo que o citótipo de 2n=50 cromossomos apresentou-se de forma diferente com relação aos sítios de rDNA 18S, os quais se apresentaram localizados em cromossomos diferentes. A distribuição da heterocromatina foi pouco variável entre os três citótipos e a região da NOR mostrou-se CG rica quando submetida ao tratamento com Cromomicina A3. Os resultados obtidos com os marcadores moleculares e de citogenética básica mostraram que parece não ocorrer intercruzamentos envolvendo os exemplares dos diferentes citótipos, uma vez que não foram encontradas fórmulas cromossômicas híbridas entre estes citótipos até o presente. Porém, se estes citótipos compartilham uma série de homologias, como evidenciado na análise dos marcadores cromossômicos, também são encontradas diferenças que poderiam ser consequência de rearranjos cromossômicos complementares, propiciando novas localizações dos sítios de rDNA e ocasionando a diferenciação e conseqüente especiação entre os exemplares dos diferentes citótipos. Os cromossomos B não apresentam homologia com os cromossomos do complemento A, sugerindo uma possível evolução independente para estes cromossomos na espécie. Estes estudos trazem informações com relação à estruturação do material genético presente no cromossomo B, além de subsídios para o entendimento dos processos envolvidos na diferenciação cromossômica em *Astyanax fasciatus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações sobre a espécie <i>Astyanax fasciatus</i>	1
1.2 Estudos citogenéticos em <i>Astyanax fasciatus</i>	3
1.3 Região da "Cuesta" de Botucatu.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.2 Metodologia Citogenética.....	15
3.3 Metodologia de Genética Molecular.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 CAPÍTULO 1: Três cariomorfos simpátricos em <i>Astyanax fasciatus</i> (Pisces, Characidae) parecem não hibridizar em populações naturais.....	30
4.2 CAPÍTULO 2: Pintura cromossômica sugere uma origem interespecífica para o cromossomo B em <i>Astyanax fasciatus</i> (Teleostei, Characidae).....	45
4.3 CAPÍTULO 3: Detecção de homeologias cromossômicas em cariomorfos de <i>Astyanax fasciatus</i> (Characidae, Characiformes) com o uso de bandamentos cromossômicos e hibridação com sequências teloméricas.....	59
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. Introdução

1.1 Considerações sobre a espécie *Astyanax fasciatus*

1.1.1 Variabilidade cariotípica

No início dos estudos citológicos entre os grupos de animais e plantas, o número cromossômico apresentado pelas espécies parecia não demonstrar grande importância evolutiva. Alguns autores afirmavam que as comparações entre cariótipos de diferentes espécies eram pouco significativas, sendo, então considerada importante a sua composição genética e não a forma e quantidade de cromossomos (White, 1954). Estudos posteriores demonstraram a importância de se estudar os cromossomos com observações citológicas sobre os sítios de recombinação, observando-se quiasmas durante a meiose e, depois, observando-se mudanças evolutivas nos cariótipos determinadas por rearranjos cromossômicos (White, 1954).

As variações cromossômicas podem se apresentar como vantajosas, neutras ou desvantajosas para o indivíduo. As desvantajosas são geralmente eliminadas e as neutras ou vantajosas se mantêm, contribuindo para a variação cariotípica da espécie (Guerra, 1988). Em peixes, fusões cêntricas e inversões pericêntricas envolvendo dois autossomos, são responsáveis por muitos casos de variação cariotípica, além de polimorfismos robertsonianos; por outro lado, a ocorrência de fissões e a presença de cromossomos supranumerários também podem alterar a composição cariotípica.

Tendo em vista que diversas espécies compartilham características cariotípicas, a busca de diferentes marcadores cromossômicos é de grande importância em análises comparativas, bem como no estudo da organização genômica das espécies. Os marcadores cromossômicos mais utilizados atualmente compõem bandamentos C, G, Q, R, a localização das Ag-RONs, os padrões de atuação das enzimas de restrição e seqüências específicas mapeadas com a aplicação da técnica de hibridação *in situ*, e (Pazza, 2005).

O sistema de identificação molecular por *Barcode* genético consiste na aplicação de uma pequena sequência de DNA mitocondrial (gene COI) para a discriminação de todas as espécies vivas do planeta como um sistema

“bioidentificador” universal (Hebert *et al.* 2003), onde as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies, sendo esta a situação mais comum, mas que existem exceções (Hurst e Jiggins, 2005).

Existe grande suporte empírico para o conceito do *Barcode* em trabalhos com invertebrados (Hebert *et al.*, 2004), pássaros (Hogg e Hebert 2004), peixes (Ward *et al.*, 2005), entre outros. Entretanto, ainda há controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (e.g., Lipscomb *et al.*, 2003, Moritz e Cícero 2004). Um grande problema é a hibridização entre espécies, pois, uma vez que o DNAmt é de herança materna, qualquer híbrido ou subsequente geração teria identificado apenas o DNA materno, o que pode gerar dúvidas taxonômicas.

A identificação inequívoca dos peixes, isto é, ovos, alevinos, adultos e seus produtos, é importante para diversas áreas e pode viabilizar, por exemplo, a detecção de fraude ou substituição de espécies em transações comerciais (Smith *et al.*, 2008), assistência na sustentabilidade e no manejo da pesca a longo prazo (Metcalf *et al.*, 2007) e ainda incremento da pesquisa em conservação na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004).

Até o momento, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizada para a identificação de espécies de peixes (Ward e Grewe 1994, Smith *et al.*, 2008) e o *Barcode* tem se mostrado uma técnica universal de identificação genética de espécies muito efetivo.

1.1.2 Considerações sobre os Characiformes

A ordem Characiformes apresenta cerca de 1400 espécies de peixes, distribuídas na África, América do Sul e América Central (Nelson, 1994). Porém, os componentes deste grupo são ainda pouco conhecidos sobre muitos aspectos, principalmente o citogenético. De acordo com Weitzman e Vari (1998), os Characiformes constituem o grupo de peixes de grande diversidade, sendo composto por cerca de 170 gêneros e 900 espécies, a maioria pertencente à família Characidae.

Segundo Géry (1977), especificamente para a região Neotropical, a família Characidae apresenta cerca de 700 espécies, constituindo-se no maior

grupo de peixes de água doce no Brasil, com cerca de 400 espécies conhecidas. Contudo, a taxonomia da família Characidae ainda se apresenta confusa devido à dificuldade de se estabelecer com clareza suas relações de origem, diferentemente do que ocorre com outros Characiformes como os Anostominae, Curimatidae, Prochilodontidae e Chilodontidae (Vari, 1983).

A subfamília Tetragonopterinae é uma das mais numerosas da família Characidae, com cerca de 500 espécies distribuídas por toda a América do Sul e Central, estendendo-se desde a fronteira do México com os Estados Unidos até a Argentina (Britski *et al.*, 1972). É constituída freqüentemente por peixes de pequeno porte que, via de regra, não ultrapassam 10 centímetros de comprimento, vivem em diferentes ambientes, a maioria é onívora e muito ativa (Britski *et al.*, 1972), sendo popularmente conhecidos como lambaris, pequiras e tambiús.

De acordo com Scheel (1973), a estrutura cariotípica dos componentes da família Characidae pode ser caracterizada por apresentar dois grandes cromossomos metacêntricos, que correspondem ao primeiro par do complemento A, sendo esta característica compartilhada por grande parte dos integrantes deste grupo. A partir deste trabalho, a constatação foi corroborada por diferentes autores como Salvador e Moreira-Filho (1992), Maistro *et al.* (1992), Margarido e Galetti (1996) e Vicente *et al.*, (1996), entre outros. Entretanto, as análises cariotípicas em Characídeos têm revelado uma grande variedade cromossômica inter e intraespecífica, bem como polimorfismos cromossômicos estruturais e numéricos, poliploidia e diferentes tipos de heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo (Carvalho, 2000), além de cromossomos supranumerários (Souza e Moreira-Filho, 1995).

1.2 Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus*

Os primeiros estudos citogenéticos em *A. fasciatus* (Characidae, *Incertae sedis*) foram realizados por Cuvier 1819 com espécies típicas de rios brasileiros. Estudos citogenéticos em peixes de água doce do Sul da América têm sido extremamente usados para revelar diferenças genéticas inter e intraespecíficas, trazendo dados importantes relacionados a espécies crípticas

e sobre a evolução da biodiversidade na região Neotropical (Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Os números diplóides predominantemente encontrados nesta espécie são de 46 e 48 cromossomos, mas podem variar de 45 a 48, apresentando diferentes fórmulas cromossômicas (Morelli *et al.*, 1983; Jin e Toledo, 1975; Centofante *et al.*, 2003; Pazza *et al.*, 2006).

Astyanax fasciatus tem sido considerado um complexo de espécies, sendo amplamente distribuído pelos rios brasileiros, onde apresenta grande diversidade cariotípica (Pazza *et al.* 2008). Populações coletadas rio Tibagi (PR) por Artoni *et al.* (2006) apresentaram citótipos portanto 48 e 50 cromossomos e ainda um indivíduo com 49 cromossomos que poderia ser considerado como consequência de uma hibridização entre os citótipos comuns.

Estudos citogenéticos realizados em exemplares provenientes da Cachoeira das Emas (Rio Mogi-Guaçu) revelaram a existência de diferentes citótipos com fórmulas cariotípicas variáveis, sendo encontrados exemplares com 46 e 48 cromossomos. A análise indicou que o citótipo $2n=48$ cromossomos representaria a espécie nativa, enquanto o outro com $2n=46$ cromossomos poderia representar uma espécie invasora (Pazza *et al.* 2008). No entanto, as formas variantes poderiam se derivadas de hibridizações entre ambos os citótipos e/ou seus descendentes (Pazza *et al.*, 2006). A manutenção de diferentes citótipos e alguns outros traços cariotípicos sugere uma recente divergência entre ambos, representando populações diferentes de *A. fasciatus* ou ainda distintas espécies. Considerando suas características biológicas associadas a dados morfológicos, esta espécie tornou-se bastante atrativa aos citogeneticistas, sendo atualmente um dos grupos de peixes mais estudados cromossomicamente da ictiofauna Neotropical. E o fato de alguns exemplares desta localidade apresentarem também cromossomos supranumerários torna seu estudo ainda mais interessante.

1.2.1 Cromossomos supranumerários

Os chamados cromossomos supranumerários ou B, também denominados de cromossomos extras ou acessórios, são elementos genômicos adicionais e não homólogos aos do complemento A. Em alguns

indivíduos e em algumas populações, os cromossomos B parecem não portar elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, sendo provavelmente originados dos cromossomos A e seguindo, posteriormente, sua própria evolução (Camacho, 1993).

A presença de um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomos supranumerários torna seu estudo necessário para identificar diferentes tipos de cromossomo B, tendo por bases principalmente suas características morfológicas e os padrões de distribuição da sua heterocromatina (Salvador e Moreira Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1996; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Néo *et al.*, 2000b). A frequência dos B pode variar nas populações, de acordo com a altitude da localidade de estudo (Néo *et al.*, 2000). Porto-Foresti *et al.* (1997), estudou a frequência dos cromossomos supranumerários e a densidade populacional de espécies de *Astyanax* em três trechos consecutivos do Córrego da Cascatinha (Botucatu, SP), tendo verificado maior frequência de cromossomo B nos indivíduos capturados das regiões mais elevadas.

Estudos feitos na espécie *scabripinnis* têm revelado a ocorrência de um polimorfismo cromossômico caracterizado pela presença de cromossomo supranumerário, tendo sido identificados diferentes tipos de cromossomo B com base na sua morfologia e nos padrões de heterocromatina constitutiva (Salvador e Moreira Filho, 1992; Maistro *et al.*, 1996; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997; Néo *et al.*, 2000b.). Também foi verificado que a frequência dos B pode variar nas populações, de acordo com a altitude da localidade de estudo (Néo *et al.*, 2000). Estudos realizados em três populações de *Astyanax scabripinnis* que ocorrem em diferentes altitudes em um mesmo riacho identificaram a presença de diferentes tipos de cromossomos B em relação à morfologia e tamanho nas duas populações de maior altitude (1920m e 1800m), assim como sua ausência na população de 700m (Néo *et al.*, 2000). Os autores concordaram que o modelo encontrado seria mais bem interpretado sob a luz da teoria parasítica de evolução de cromossomo B, segundo a qual esses elementos seriam mais freqüentes em condições ambientais mais favoráveis para a espécie. Néo *et al.* (2000b) propuseram que o macrocromossomo B metacêntrico, bem como o microcromossomo,

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

Outras ocorrências de cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* foram descritas também nos exemplares capturados no rio Jacu (ES), tendo sido evidenciados de 0 a 4 microcromossomos supranumerários restritos somente aos machos da espécie (Rocon Stange e Almeida-Toledo, 1993). Em diferentes populações estudadas por Salvador e Moreira-Filho (1992) em Campos de Jordão (SP), os autores verificaram a ocorrência de 1 a 2 cromossomos B metacêntricos em exemplares de ambos os sexos. Ainda nesta mesma região, Vicente *et al.* (1996) verificaram a ocorrência de cromossomos B em três populações, todas apresentando variação na frequência dos cromossomos extras entre os sexos e entre as populações. Entretanto, em uma população de *Astyanax scabripinnis* da bacia do Paraná foi observada uma variação intraindividual de 0 a 2 microcromossomos B, presentes somente em células de fêmeas (Mizoguchi e Martins-Santos, 1997). Macrocromossomos B restritos somente às células de fêmeas de *Astyanax scabripinnis* foram também encontrados em uma população do rio Araquá (Maistro *et al.*, 1994). Estudos posteriores realizados por Porto-Foresti *et al.* (1997) evidenciaram a presença de cromossomos B em exemplares de ambos os sexos para a população do córrego Cascatinha.

Apesar de já existir grande número de informações com diferentes tipos de abordagem e que estudos em diversos grupos de organismos estejam sendo realizados com a finalidade de se entender a origem e possíveis funções dos enigmáticos cromossomos B, existem ainda muitas perguntas sem respostas. Sendo assim, as pesquisas que estão sendo realizadas no grupo sobre esses cromossomos têm a finalidade de buscar uma melhor compreensão dos processos de origem e fixação destes elementos genômicos nas populações e também da sua possível função, buscando desvendar o papel desses cromossomos no genoma dessa espécie.

1.2.2 Mapeamento genômico

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado que as seqüências de DNA e genes podem ser muito utilizados como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, além da grande possibilidade de sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcadores citogenéticos entre diferentes espécies.

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

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

Numa grande maioria dos grupos de peixes bastante estudados atualmente como os ciclídeos, por exemplo, a construção de bibliotecas genômicas para o mapeamento genético e físico das espécies está voltado para as espécies africanas, como *Oreochromis niloticus* (Katagiri *et al.*, 2001) e *Haplochromis chilotes* (Watanabe *et al.*, 2003). Além disto, já existem descritos na literatura um mapa genético de ligação construído a partir de microssatélites e AFLPs (Anonymous Fragment Length Polymorphisms) (Kocher *et al.*, 1998) e

o primeiro mapa físico que reúne todos os tipos de seqüências repetitivas já mapeadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2004).

1.2.3 Mapeamento cromossômico e seqüências repetitivas de DNA

Os primeiros estudos com genomas completamente seqüenciados foram focados nas seqüências de cópia única ou com pequeno número de cópias. Pouca atenção foi dada então, aos DNA repetitivos e segmentos duplicados. Na maioria dos organismos, as seqüências repetitivas compreendem uma grande porção do genoma. Em cebola elas representam 95% (Flavell *et al.*, 1974) e em humanos 50% ou mais (The Genome International Sequencing Consortium, 2001) e a variação no tamanho do genoma de diferentes eucariotos é frequentemente associada a diferenças na quantidade de seqüências repetitivas (Kidwell, 2002).

Ainda não se sabe ao certo qual a função das seqüências repetitivas, as quais foram consideradas por muitos anos como DNA “egoísta” (Doolittle e Sapienza, 1980; Orgel e Crick, 1980) ou como DNA “lixo” (Nowak, 1994), não sendo aparentemente responsáveis por nenhuma contribuição biológica para seus carregadores. Por outro lado, alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento destas seqüências com algumas doenças (Kazazian *et al.*, 1988), na regulação e reparo de alguns genes (Messier *et al.*, 1996), assim como na diferenciação de cromossomos sexuais (Anleitner e Haymer, 1992; Kraemer e Schmidt, 1993). Recentemente tem sido demonstrado que tais seqüências podem ser extremamente importantes na organização estrutural e funcional dos genomas (Schuller *et al.*, 1993) porém, a função mais significativa das seqüências repetitivas está relacionada à presença dos segmentos repetitivos dos centrômeros e telômeros nos cromossomos dos eucariotos.

Os DNAs repetitivos incluem as seqüências organizadas em cadeias como as seqüências satélites, minissatélites e microsatélites e as seqüências dispersas, como os transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994). Além dessas classes, há também as famílias multigênicas compostas por centenas ou milhares de cópias de seqüências que codificam importantes moléculas como os RNAs ribossômicos (rRNA) e as histonas, por exemplo.

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

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

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

Outro passo importante no estudo dos cromossomos foi obtido a partir da introdução da metodologia de microdissecção de cromossomos. A obtenção de sondas cromossômicas por microdissecção, seja de regiões específicas ou de um cromossomo inteiro (WCP:Whole Chromosome Painting), foi possível graças ao desenvolvimento de primers universais que permitem a amplificação de grandes regiões de DNA através de DOP-PCR (DNA Degenerate Oligonucleotide-Primed). Na síntese de sondas para WCP é feita, em um primeiro passo, uma amplificação inespecífica utilizando-se primers

degenerados. Em um segundo passo tem-se uma amplificação específica e, finalmente, o DNA é marcado para funcionar como uma sonda de FISH.

Pode ser considerado, portanto, que o conhecimento da estrutura molecular dos cromossomos das espécies e a realização do mapeamento genômico de indivíduos de diferentes populações, realizados com base na localização e dispersão de genes específicos ou de sítios repetitivos como dos genes ribossomais 5S e 18S, poderão fornecer informações concretas sobre a dinâmica destes genes nos cariótipos das espécies e sobre os mecanismos de diversificação cromossômica nas espécies, contribuindo com estudos filogenéticos e evolutivos neste grupo.

1.2.4 Microdissecação Cromossômica

A citogenética molecular tornou possível localizar fragmentos clonados de DNA em bandas cromossômicas específicas. Inversamente, fragmentos de DNA de qualquer banda ou de regiões cromossômicas ou, ainda, de cromossomos inteiros podem ser obtidos por microdissecação e microclonagem. A microdissecação física de uma região específica de um cromossomo e a recuperação dos fragmentos de DNA desta região apresentam a vantagem de permitir a obtenção de um grande número de clones de uma área cromossômica em pouco tempo, sendo a abordagem mais direta para análise detalhada molecular e para o mapeamento fino estrutural.

Em 1981, a microdissecação cromossômica foi primeiramente aplicada nos cromossomos politênicos de *Drosophila*. Depois, cromossomos humanos e de camundongo foram usados para clonagem de sequências de DNA de regiões específicas, sendo que nestes experimentos eram utilizados micromanipuladores manuais para coletar partes de cromossomos com agulhas de vidro. Aproximadamente 100 cromossomos dissecados eram necessários para purificar e ligar o DNA cromossômico ao vetor de clonagem (Yonenaga-Yassuda, 2004).

Ludeche *et al.* (1989) desenvolveram técnica mais precisa para dissecação de cromossomos bandeados GTG, o que melhorou a identificação dos cromossomos e aumentou a qualidade da técnica de microdissecação. Posteriormente, a reação de cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada para

amplificar o DNA dissecado e assim, várias bibliotecas cromossomo-específicas puderam ser construídas. Uma revisão sobre microdissecção foi apresentada por Cannizzaro (1996), que considera a técnica uma poderosa ferramenta que permite dissecar o DNA da menor banda de cromossomos humanos e de marcadores cromossômicos de qualquer outro organismo, eucarioto e procarioto.

A microdissecção de diferentes cromossomos de porco focalizou regiões genômicas onde existem genes de importância econômica. Também foram realizadas comparações de segmentos do cromossomo X de bovino com os de X de ovelha, cabra e búfalo. O cromossomo X dos Bovidae tem atraído atenção especial pelas variações estruturais detectadas entre essas diferentes espécies. Usando abordagens citogenéticas, várias hipóteses foram aventadas para explicar a atual morfologia do cromossomo X de búfalo (Hassanane *et al.*, 1998).

A técnica de MicroFISH foi desenvolvida por Meltzer *et al.*, (1992), para a síntese de sondas de regiões específicas dos cromossomos, marcação específica de partes dos cromossomos e ainda para a caracterização de aberrações cromossômicas. Nos procedimentos de desenvolvimento dos protocolos de MicroFISH, quatro importantes passos devem ser bem ressaltados: (1) a dissecação física de parte do cromossomo ou de um marcador cromossômico; (2) a incubação do material dissecado com proteinase K ou topoisomerase para relaxar a fita dupla de DNA de parte do cromossomo metafásico; (3) a utilização de um *primer* de oligonucleotídeo degenerado (DOP-PCR) para a amplificação do material dissecado e (4) a marcação do produto de PCR com biotina ou digoxigenina, seguida por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda obtida. Este estudo foi descrito para simplificar e melhorar o método para a microdissecção, desintegrando o material dissecado e utilizando o DOP-PCR, com baixo risco de contaminação.

1.3 Região da “Cuesta” de Botucatu

A bacia do rio Paraná-Paraguai é formada por grandes rios como os rios Tietê, Grande e Paranapanema. Na região central do Estado de São

Paulo, os acidentes de relevo constituem a chamada Serra de Botucatu. Nela existem muitos rios e ribeirões de cabeceira, componentes de uma área específica com drenagem em três direções, formando componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê, Paranapanema e Pardo, este último caracterizado como um grande tributário do Rio Paranapanema (Maistro *et al.*, 1998).

A cidade de Botucatu está localizada a 280 km da cidade de São Paulo e é circundada por nascentes, ribeirões, rios e vales verdes de natureza preservada. Faz parte do relevo da região a chamada “Cuesta” de Botucatu, uma formação geológica ímpar, que se caracteriza por conter um paredão abrupto (*front*) que possui face voltada a leste e segue um leve declínio que se estende a oeste até a margem do rio Paraná, constituindo-se num importante divisor de águas, com nascentes que correm para o rio Tietê e para o rio Paranapanema. As nascentes e seus córregos, riachos e rios, em associação à escarpa da Cuesta, são responsáveis pelo grande número de cachoeiras, que representam barreiras naturais e caracterizam ambientes diferenciados, propícios ao estabelecimento de faunas diferenciadas e diversificadas. Tal situação é constatada pela ocorrência de pelo menos três diferentes citótipos sintópicos de *Astyanax fasciatus* (Figura 1), espécie objeto do presente estudo no Ribeirão Água da Madalena (Figura 2).

2. Objetivos

Embora já existam estudos identificando a fórmula cariotípica, diferenças estruturais dos cromossomos e características cariotípicas específicas em *Astyanax fasciatus*, o presente projeto visou ao melhor conhecimento da estrutura cromossômica das células eucariontes e em particular dos peixes. Procurou-se identificar os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica e, por conseguinte, de especiação neste grupo de organismos com o uso de técnicas citogenéticas e moleculares. Desta forma, os objetivos específicos deste projeto foram:

- obter preparações de cromossomos mitóticos de em *Astyanax fasciatus* para a caracterização das populações;

- aplicar técnicas de bandamento para identificação estrutural dos cromossomos (Bandas C; identificação das NORs; tratamentos com fluorocromos – CMA3 e 5-Bromo-deoxiuridina);
- mapear a localização de genes repetitivos do tipo de DNA ribossômico 5S e 18S, bem como As51, histonas H3 e H4 e sequências telométicas, identificando sua posição de associação em cromossomos mitóticos de diferentes populações desta espécie, com a utilização da técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH);
- realizar a microdissecção do cromossomo B de *A. fasciatus* e a amplificação do seu material genético por DOP-PCR, visando à obtenção de sonda específica para pintura de cromossomos inteiros (WCP) no genoma da espécie e sua aplicação em diferentes citótipos. Pretendeu-se verificar o grau de homologia entre o cromossomo B e os demais cromossomos do complemento A, na busca de informações sobre a ancestralidade do grupo;
- estabelecer os mecanismos envolvidos no processo de diversificação cariotípica neste grupo de populações e na espécie, pela análise da dinâmica de dispersão dos segmentos genômicos mapeados.

3. Material e Métodos

Com a utilização de redes, puçás e peneiras, foram capturados exemplares de *Astyanax fasciatus* (Figura 1), coletados no ribeirão Água da Madalena, região de Botucatu-SP (Figuras 2 e 3). Os animais capturados foram acondicionados em vasilhas plásticas para transporte e o processamento do material foi realizado no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, em Botucatu-SP. Todos os exemplares coletados e processados foram fixados em formol 10% e posteriormente conservados em álcool 70%, identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório.



Figura 1. Exemplar da espécie *Astyanax fasciatus*, tamanho 9.0 cm.



Figura 2: Mapa do local de coleta, Ribeirão Água da Madalena (em vermelho), região de Botucatu, no Estado de São Paulo.



Figura 3: Local de coleta, cachoeira Véu da Noiva, ribeirão Água da Madalena, Botucatu SP.

Foram realizadas análises de citogenética convencional, onde foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti et al., 1981), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972). Também foram aplicadas análises de citogenética molecular, onde foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC, com o uso do fluorocromo Cromomicina A3 (Schweizer, 1976); localização cromossômica de DNAr 18S e 5S, localização dos genes para histonas H1 e H4 e para uma região satélite As51; localização cromossômica das sequências teloméricas (TTAGGG)_n e localização de sondas específicas para os cromossomos B, obtidas por microdissecção e pintura cromossômica.

3.1 Metodologia Citogenética

3.1.1 Estimulação de mitoses

Antes do início da aplicação de protocolos para a obtenção das preparações cromossômicas, os exemplares foram submetidos a tratamento específico com o objetivo de estimular a divisão das células do tecido hematopoiético dos peixes (rim) e, assim, aumentar o índice mitótico, conforme descrito abaixo, seguindo protocolo de técnica inicialmente descrita para anfíbios e répteis por Cole e Leavens (1971), utilizada em pequenos mamíferos por Lee e Elder (1980) e em peixes por Oliveira *et al.*, (1988). O protocolo técnico é descrito como segue:

- injetar suspensão de levedura (0.5g de fermento de padaria, 1.5g de dextrose e 6ml de água; na proporção de 1ml/100g de peso do animal) na região intraperitoneal dos animais.
- manter os animais em aquário aerado durante um período de 48 horas antes do sacrifício para retirada dos tecidos de interesse.

3.1.2 Obtenção dos cromossomos mitóticos por preparações diretas

Para obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica convencional de preparação direta ("air-drying"), descrita por Egozcue (1971) e por Cestari (1973), e posteriormente utilizada por Foresti *et al.* (1981). A metodologia utilizada encontra-se descrita abaixo:

- injetar solução aquosa de colchicina 0,0025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) com uma seringa, na região abdominal dos animais, entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Os animais são mantidos em aquário bem aerado, por um período de 40 minutos. Este tempo foi padronizado para a espécie analisada. Após este período, o animal era sacrificado para a retirada de fragmentos de tecido renal (porção anterior) com o auxílio de tesoura e pinças, que eram colocados em uma pequena placa de Petri contendo 7ml de solução hipotônica (KCL 0,075M). Com o auxílio de pinças e uma pipeta Pasteur, o tecido era dissociado até se obter uma suspensão celular homogênea, que era transferida para um tubo de centrífuga e mantida em

estufa a 37°C, durante 21 minutos. Após este tempo, o material era ressuspensão cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Algumas gotas de fixador (metanol + ácido acético) recém-preparado eram acrescentadas ao material, que era novamente ressuspensão de modo suave e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, a suspensão era centrifugada por 10 minutos a 1000rpm e o sobrenadante descartado. Esse procedimento de fixação do material era repetido por mais duas vezes e, após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, aproximadamente 1ml de fixador era adicionado para ressuspender o material obtido, para obtenção da suspensão final.

As preparações celulares obtidas podem ser armazenadas em freezer a -20°C, acondicionadas em tubos de 1,5ml ou utilizadas para as preparações de lâminas que é feita pingando-se 2 gotas da suspensão sobre a lâmina, secando o material ao ar. A coloração do material era feito com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão (KH₂PO₄ 0,06M e Na₂HPO₄ 0,449M, pH 6.8) durante 10 minutos e, após este tempo a lâmina era lavada com água destilada ou água corrente e deixada para secar ao ar.

3.1.3 Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandas C)

Para visualização da heterocromatina constitutiva (Bandas C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas adaptações, conforme descrito abaixo:

- tratar o material preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCL 0,2N à temperatura ambiente durante 30 minutos. Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar ao ar. Logo após este processo, mergulhar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário (Ba(OH)₂·8H₂O) 5% a 60°C durante 5-12 segundos. Para interromper a ação do bário, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCL 1N a 60°C, lavá-la em água corrente ou destilada e logo após, colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a 60°C durante 30 minutos, em seguida corar com solução de Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 10 minutos.

3.1.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), através de impregnação com nitrato de prata

A metodologia que utiliza a impregnação dos cromossomos com nitrato de Prata (Ag-NO₃) foi utilizada para identificação das regiões organizadoras de nucléolos que se encontravam ativas na interfase precedente. A técnica, descrita por Howell & Black (1980), encontra-se detalhada abaixo:

- hidrolisar as lâminas contendo a preparação cromossômica por 3 minutos em HCL 1N à 60°C, em seguida lavar em água destilada. Sobre a lâmina preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, depositar 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1ml para cada 100ml de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira. Adicionar sobre a gota anterior, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% mantida em frasco escuro a 4°C, cobrir a lâmina com uma lamínula e incubar sobre um suporte em banho-maria a 60°C por aproximadamente 3 minutos. Após o tempo apropriado, lavar a lâmina em água destilada ou corrente, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Pode-se corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6.8) durante 20 a 30 segundos. Lavar em água corrente e deixar secar ao ar para a observação em microscópio.

3.1.5 Coloração cromossômica com o fluorocromo Cromomicina A3

Neste tipo de coloração foi utilizado um com pequenas adaptações daqueles desenvolvidos por Sumner (1990) e Fukui e Nakayama (1996). Preparações envelhecidas por 7 dias, previamente incubadas em tampão McIlvaine pH 7,0 contendo 0,5mM de MgCl₂, por 20 minutos, foram coradas com Cromomicina A3-CMA (SigmaTM) em câmara úmida, no escuro e à temperatura ambiente.

A solução de CMA foi preparada em concentração de 0,1 mg/ml, em tampão McIlvaine contendo 0,5mM de MgCl₂ e armazenada em geladeira por no mínimo 24 horas antes do uso. Após 30 minutos de coloração, as lâminas foram lavadas cuidadosamente com solução-tampão e secas ao ar. A mesma solução-tampão contendo MgCl₂ foi utilizada para a montagem da lâmina que

foi coberta com lamínula e vedada com esmalte incolor. Para estabilizar a fluorescência, as lâminas ficaram armazenadas em geladeira (4°C) por cerca de 24 horas, sendo, então, examinadas em microscópio de fluorescência usando comprimento de ondas de 430 a 480 nm.

Algumas lâminas anteriormente utilizadas para o bandamento com DAPI foram descoradas em três baterias de álcool absoluto durante trinta minutos e, então, submetidas ao protocolo descrito para o bandamento com CMA. Assim, foi possível obter a coloração seqüencial de algumas metáfases.

3.1.6 *Bandamento R (5-Bromodeoxiuridina)*

Para a incorporação da 5-Bromodeoxiuridina os animais foram previamente injetados com solução de 5-BrdU a 25 µg/ml, na proporção de 0,1 ml/10g de massa corporal cerca de 5 a 6 horas antes do sacrifício dos animais. A preparação dos cromossomos mitóticos e aplicação do protocolo de bandamento foram realizadas conforme Almeida-Toledo et al., (1993). Depois de obtida a lâmina com a preparação, a mesma foi corada com solução Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH=6.8) por 10 minutos, com secagem ao ar para posterior análise.

3.1.7 *Análises das preparações cromossômicas*

As imagens das preparações com cromossomos metafásicos foram capturadas utilizando microscópio óptico Olympus BX-62, software de captura Image-Pro MC v 6.0 e processada em Adobe Photoshop v 7.0. Os cariótipos foram montados a partir de medidas cromossômicas realizadas nas metáfases, conforme proposto por Levan et al., (1964).

3.1.8 *Hibridação in situ fluorescente (FISH)*

- Sondas de rDNA 18S, 5S e As51

A metodologia de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) empregada em cromossomos metafásicos baseou-se em procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986) e em modificações apresentadas por Martins e Galetti (1999) e Wasko e Galetti (2000). Esta técnica foi utilizada para a hibridação *in situ*

fluorescente dos genes ribossomais 18S e 5S, feita na forma de Double-FISH, onde as duas sondas são hibridadas simultaneamente, utilizando diferentes fluorocromos para marcação na mesma lâmina, cujo protocolo encontra-se descrito a seguir:

- o material foi marcado com digoxigenina-11-dUTP para as sondas de rDNA 18S e As51 e com biotina-11-dATP para a sonda de rDNA 5S, através de “Nick translation” utilizando o kit Bionick™ Labelling System (Gibco.BRL), seguindo as especificações do fabricante. Para sua aplicação deve-se adicionar em um tubo de 1.5ml, misturar 5µl de dNTP Mix 10x, 1µg de DNA (sonda), 5µl de Mix de enzima 10x e água estéril para completar 45µl. Incubar a solução a 16°C por 2 horas e, após este período, adicionar 5µl de tampão de parada, acetato de sódio 3M a 1/10 do volume e dois volumes de etanol absoluto gelado. Misturar o tubo por várias vezes e manter a -20°C por pelo menos 3 horas. Centrifugar o material a 13.000rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar 50µl de álcool 70% gelado. Centrifugar mais uma vez o material a 13.000rpm por 5 minutos e secar em estufa a 37°C. Ressuspender a sonda já marcada em 80µl de água estéril e adicionar solução de formamida 50%, sulfato de dextrano 10% e 2xSSC (NaCl 0.29M, Na₃C₆H₅ 0.029M, pH 7.0). Denaturar esta solução de hibridação em banho fervente por 10 minutos e transferi-la imediatamente para um recipiente com gelo.

Anteriormente à hibridação, pré-tratar as lâminas contendo as preparações cromossômicas com solução de RNase (40µg/ml em 2xSSC) durante 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, lavar as lâminas por 10 minutos em solução de 2xSSC por duas vezes e 26 desidratá-las em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 10 minutos cada série, à temperatura ambiente. Denaturar as lâminas em formamida 70%/2xSSC por 5 minutos a 70°C e posteriormente desidratá-las em série alcoólica a 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada série a -20°C. Aplicar 40µl da solução de hibridação contendo cerca de 150ng de sonda, sobre cada lâmina e cobrir com uma lamínula. Após incubação durante 12-14 horas a 37°C em câmara úmida, lavar as lâminas por duas vezes em solução formamida 50%/2xSSC por 15 minutos a 37°C e posteriormente por mais duas vezes em

2xSSC por 15 minutos a 37°C. Realizar mais uma lavagem em 4xSSC por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Sobre cada lâmina, colocar 100µl de FITC 0.07% (fluoresceína Isotioanato) conjugada à avidina e diluída em tampão C (bicarbonato de sódio 0.1M e NaCl 0.15M, pH 8.5). Cobrir com uma lamínula e incubar a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. Lavar as lâminas por 3 vezes (5 minutos cada) em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1.26%, citrato de sódio 0.018%, Triton 0.038% e leite desnatado 1%) a 42°C. Após a lavagem, colocar 100µl de anticorpo anti-avidina biotinilada 2.5% sobre cada uma das lâminas, cobrir com lamínula, e mantê-las a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Realizar a lavagem das lâminas utilizando o mesmo tampão de bloqueio. O sinal de hibridação pode ser aumentado através de sucessivos passos utilizando avidina-FITC e anti-avidina por 3 vezes durante 5 minutos cada e em tampão de bloqueio a 42°C e, posteriormente, por duas vezes em solução de Triton 20/4xSSC por 3 minutos cada vez. Utilizar 1µl de iodeto de propídio (50µg/ml) com 25µl de solução “antifade” (Vectashield antifade-Vector) para fazer a contra-coloração das lâminas.

3.1.9 *Microdissecção de cromossomos*

Os procedimentos para a microdissecção de cromossomos (Mühlmann et al., 1995) consistiram em:

1. Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente.
2. Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,06M e Na₂HPO₄ 0,449M, pH 6.8) durante 8-10 minutos.
3. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.
4. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder a microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf).
5. Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR e proceder à DOP-PCR:

Essa PCR consistiu numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados com o uso de um *primer* degenerado (DOP- *Degenerate Oligonucleotide Primer*) proposto por Telenius et al. (1992). A DOP-PCR compreendeu duas etapas de amplificação, uma de baixa estringência (primeira PCR) e outra de alta estringência (segunda PCR e PCR de marcação).

- Na primeira PCR (primeira amplificação), condições de baixas temperaturas permitem o anelamento do *primer* degenerado e a extensão de vários sítios no genoma. Em tubo de 0,5ml, preparar um mix contendo os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	6,0µL
Tampão Termosequenase (10x)	1,0µL
dNTP (2mM cada)	1,0µL
Primer DOP (10µM)	1,0µL

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0,5mL, contendo 9,0µL mix de DOP-PCR, estes foram aquecidos 95°C por 10 min e centrifugados brevemente. Em seguida, acrescentou-se 1,0µL da enzima Termosequenase 4U/µl (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB).

As amplificações foram realizadas num termociclador PTC- 200TM Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

12 ciclos de 94°C por 1min e 30seg; 37°C por 2min; 37°C por 1min, subindo 0,2°C/seg até 72°C; e 72°C por 2min.

30 ciclos de 94°C por 1min e 30 seg; 62°C por 1min; 72°C por 2min; e manutenção a 4°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

A segunda PCR (segunda amplificação) foi preparada para um volume final de 50 µL num tubo de 0,5mL, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	30,0µL
Tampão da enzima (10x)	5,0µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5µL
dNTP (2mM cada)	5,0µL
Primer DOP (10µM)	5,0µL
Taq (5U/µl)	0,5µL
DNA - Produto da 1ª PCR	3,0µl

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

30 ciclos de 90°C por 3min; 90°C por 1min e 30 seg; 56°C por 1min e 30 seg; 72°C por 1min e 30 seg; e manutenção a 4°C.

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

- PCR de marcação:

Na PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo para um volume final de 50µL. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.

Água milli-Q autoclavada	30,7µL
Tampão da enzima (10x)	5,0µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5µL
dATP (2mM)	1,0µL
dCTP (2mM)	1,0µL
dGTP (2mM)	1,0µL
dTTP (2mM)	0,6µL
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0,7µL
Primer DOP (10µM)	5,0µL
Taq (5U/µl)	0,5µL
DNA - Produto da 2ª PCR	3,0µL

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

- Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 50 µL, num tubo de 0,5mL, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	37 µL
Tampão (10X)	5,0 µL
MgCl (50mM)	1,5 µL
dATP (2mM)	1,5 µL
dCTP (2mM)	1,5 µL
dGTP (2mM)	1,0 µL
dTTP (2mM)	0,7 µL
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0,6 µL
Primer A (2µM)	1,0 µL
Primer B (2µM)	1,0 µL
Taq (5U/µL)	0,2 µL

A amplificação foi realizada num termociclador PTC-200TM Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

30 ciclos de 95°C por 5 min; 95°C por 40 seg; 50°C por 40 seg; 72°C por 5 min; e manutenção a 15°C.

Os produtos desta reação, checados em gel de agarose 1%, por serem grandes demais, foram cortados com DNase, em uma reação com volume final de 75 uL, com base na seguinte reação: produto PCR – 50,0 uL; tampão – 7,5uL; DNase (0,1U/uL) – 1,0 uL; água milli-Q autoclavada – 16,5uL.

- Preparação da sonda para Histona H3

Para o isolamento e amplificação de sequências parciais do gene da Histona H3, foram utilizados os *primers* degenerados H3F (5'-GGC NMG NAC

NAA RCA RAC-3') e H3R (5'-TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT-3') gentilmente cedidos pelo Msc Daniel Blanco e pelo Dr Orlando Moreira Filho, do Laboratório de Genética e Evolução da UFSCar de São Carlos. Estes *primers* foram desenhados utilizando como molde sequências das espécies *Danio rerio* (número de acesso no Genbank CU855770) e *Oncorhynchus mykiss* (número de acesso no Genbank X02624), o que permitiu a obtenção de fragmentos de DNA de aproximadamente 630 pb para serem utilizados como sonda. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25µL num tubo de 0,5mL com os seguintes parâmetros: 1µl de DNA molde, 0,5µl de cada primer, juntamente com 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl (50mM); 2,0µl de dNTPs (2mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 25µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose.

A sonda para a Histona H3 foi marcada com biotina-14-DATP (Roche Applied Science) por meio de uma reação de PCR com um volume final de 50µl, com os seguintes parâmetros: 2µl de DNA molde; 1µl de cada *primer*, juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 1,5µl de MgCl (50mM); 1,5µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,8µl dTTP (2mM cada; 0,7µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,4µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 50µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-200TM Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc), de acordo com as seguintes condições:

30 ciclos de 95°C por 5 min; 95°C por 30 seg; 52°C por 45 seg; 72°C por 20 seg; 72°C por 7 min e manutenção a 15°C.

- Preparação da sonda para Histona H4

Para o isolamento e amplificação de sequências parciais do gene da Histona H4 foram utilizados os *primers* degenerados H4 F (5' ATG GCA GAA RYC GCM CCA GC 3') e H4 R (5' TAC TTC TTC TTG GGS GCT GC 3'), cedidos pelo Msc Daniel Blanco e pelo Dr Orlando Moreira Filho do Laboratório de Genética e Evolução da UFSCar de São Carlos. Estes *primers* foram desenhados utilizando como molde sequências das espécies *Danio rerio* (número de acesso no Genbank CU855770) e *Oncorhynchus mykiss* (número

de acesso no Genbank X02624), o que permitiu a obtenção de fragmentos de DNA de aproximadamente 630 pb para serem utilizados como sonda. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25µL num tubo de 0,5mL, com os seguintes parâmetros: 1µl de DNA molde; 0,5µl de cada *primer*, juntamente com 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl (50mM); 2,0µl de dNTPs (2mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 25µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose.

A sonda para a Histona H4 foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por meio de uma reação de PCR com um volume final de 50µl, com os seguintes parâmetros: 2µl de DNA molde; 1µl de cada *primer*, juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 1,5µl de MgCl (50mM); 1,5µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,8µl dTTP (2mM cada); 0,7µl de Digoxigenina-11-dUTP; 0,4µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 50µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-200TM Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

30 ciclos de 95°C por 30 seg; 52°C por 45 seg; 72°C por 20 seg; 72°C por 7 min e manutenção a 15°C.

3.2 Metodologia de Genética Molecular

3.2.1 Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

Esta técnica, descrita por Sambrook e Russel, 2001, envolve fundamentalmente a extração e a purificação do DNA pela ação combinada de detergentes, proteinase K e RNase, lavagem com fenol/clorofórmio e posteriormente, a sua precipitação pelo cloreto de sódio e etanol, conforme protocolo descrito a seguir:

- fragmentar os pedaços de tecido (fígado, brânquias ou músculos) fixados em etanol em cadinhos com N₂ líquido. Adicionar ao macerado de tecido 3,98 ml de solução digestão (NaCl 0,1M; Tris-HCL 0,01 M pH=8,0; EDTA 0,025M pH=8,0; SDS 0,5%; RNase 100 µg/ml; H₂O q.s.p.) e transferir, juntamente com 3,98 ml de solução de digestão, para tubos Falcon de 15 ml. Colocar em

banho-maria a 50 °C por meia hora. Passado esse tempo, cada tubo Falcon receberá 20 µL de proteinase K 100 µg/ml, permanecendo por mais duas horas no banho-maria a essa temperatura. Retirar os tubos do banho-maria e adicionar 4 ml de mistura Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (50:48:2), e agitar os tubos (bem fechados) suavemente por cerca de 15 minutos, até misturar bem os componentes. Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm e transferir a camada superior do tubo (DNA) para tubos novos, tomando o cuidado para não pegar a camada de proteínas. Acrescentar 0,2 volumes de NaCl 1M, de acordo com o volume obtido no item anterior e mais 2 volumes de etanol 100% gelado e movimentar suavemente o tubo para precipitar o DNA. Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm. Descartar o sobrenadante, acrescentar cerca de 4 ml de etanol 70% gelado e centrifugar como no item anterior. Descartar o sobrenadante e levar o tubo para a estufa a 37 °C por até 30 minutos. Deixar *overnight* até secar o DNA. Adicionar até 1 ml de água Milli-Q autoclavada e deixar na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.

3.2.2 Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose

A integridade do DNA é analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001), seguindo o seguinte procedimento:

- para montar a placa de eletroforese, diluir a agarose (Ultra Pure™ Agarose - Invitrogen Life Technologies) em um volume apropriado de tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) para que o gel fique em uma concentração de 1 %. Aquecer a solução até que esta fique translúcida. Deixar a solução esfriar um pouco e aplicar no suporte da cuba de eletroforese horizontal; ajustar o pente na cuba e deixar a solução de agarose polimerizar, enquanto a cuba de eletroforese é preenchida com tampão TAE 1X. Preparar o DNA a ser aplicado utilizando 2µL de tampão LB e realizar a aplicação das amostras no gel, juntamente com um DNA marcador de peso molecular conhecido (Low DNA Mass Ladder) e submeter à eletroforese a 110V/150mA por 1 hora. Corar o gel em solução de brometo de etídio (10 mg/ml) diluída a 0.1% em tampão TAE 1X. Realizar a observação do gel em transiluminador (Hoefler UV-25) sob luz

ultravioleta e posteriormente analisar a foto documentação através do programa EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D*). Os pesos moleculares das amostras são estimados através da comparação com o marcador.

3.2.3 Barcode Genético

O sistema de identificação molecular por *Barcode* genético foi proposto por Hebert *et al.* (2003) e consiste na aplicação de uma pequena sequência de DNA mitocondrial (gene COI) para a discriminação de todas as espécies vivas do planeta como um sistema “bioidentificador” universal.

Existe grande suporte empírico para o conceito do *Barcode* em trabalhos com invertebrados (Hebert *et al.*, 2004), pássaros (Hogg e Hebert 2004), peixes (Ward *et al.*, 2005), entre outros. Entretanto, ainda há controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (e.g., Lipscomb *et al.*, 2003, Moritz e Cícero 2004). Para o efetivo funcionamento do *Barcode*, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies. Estudos recentes demonstram que esta é a situação mais comum, mas que existem exceções (Hurst e Jiggins, 2005). Outro problema é a hibridização entre espécies, pois, uma vez que o mtDNA é de herança materna, qualquer híbrido ou subsequente geração teria identificado apenas o DNA materno, o que poderia gerar dúvidas taxonômicas.

A identificação inequívoca dos peixes, nas suas diferentes fases da vida como ovos, alevinos, adultos e seus produtos, é importante para diversas áreas e pode viabilizar, por exemplo, a detecção de fraudes ou substituições de espécies em transações comerciais (Smith *et al.*, 2008), assistência na sustentabilidade e no manejo da pesca a longo prazo (Metcalf *et al.*, 2007) e ainda o incremento das pesquisas em conservação, atuando na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004). Até o momento, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizada para a identificação de espécies de peixes (Ward e Grewe 1994, Smith *et al.*, 2008) e o DNA *Barcode* tornou-se a técnica universal de identificação genética de espécies, com aproximadamente 4824 espécies já analisadas.

4. Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécimens de *Astyanax fasciatus* resultaram em artigos científicos que são apresentados a seguir, na forma de capítulos. A aplicação da metodologia de Barcode Genético foi feita no intuito de identificar os três cariomorfos encontrados e efetuar sua caracterização como sendo da espécie *Astyanax fasciatus*.

As referências citadas nos textos encontram-se relacionadas no item final da tese.

Capítulo 1

Três cariomorfos simpátricos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) parecem não hibridizar em populações naturais.

Maressa Ferreira-Neto, Roberto Ferreira Artoni, Marcelo Ricardo Vicari, Orlando Moreira-Filho, Juan Pedro Martinez Camacho, Mohammed Bakkali, Claudio de Oliveira, Fausto Foresti - Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. Publicado em Comparative Cytogenetics 6(1): 29–40 (2012)

Abstract

Ninety individuals of the characid fish *Astyanax fasciatus* were collected at Água da Madalena stream (Botucatu, São Paulo, Brazil) and analyzed for chromosome number and morphology as well as for chromosome location of 5S and 18S ribosomal DNA (rDNA). Whereas no chromosome differences were associated to sex, three different cytotypes were found for $2n=46$, $2n=48$ and $2n=50$ chromosomes, with no intermediate numbers. In addition, the $2n=50$ cytotype showed some differences in 18S rDNA location in respect to the two other cytotypes. Finally, all specimens showing the $2n=46$ cytotype showed the presence of a partly heterochromatic macro supernumerary chromosome, which was absent in all individuals with the two other cytotypes. All these results strongly suggest that these three cytotypes do not hybridize in this natural populations and it is thus likely that they can constitute true species.

Resumo

Noventa indivíduos de *Astyanax fasciatus* foram coletados no ribeirão Água da Madalena (Botucatu, São Paulo, Brasil) e analisados com relação ao número cromossômico diplóide e composição cariotípica, bem como para a localização cromossômica do DNA ribossomal (DNAr) 5S e 18S. Considerando que não há diferenças cromossômicas associadas ao sexo, foram encontrados três cariomorfos diferentes com números diplóides de 46, 48 e 50 cromossomos, mas nenhuma fórmula cromossômica intermediária foi descoberta. O cariomorfo $2n=50$ mostrou algumas diferenças na localização do DNAr 18S em relação aos dois outros cariomorfos. Finalmente, em todas as amostras com cariomorfo $2n=46$ foi constatada a presença de um macrocromossomo supranumerário parcialmente heterocromático, que estava ausente nos indivíduos dos outros dois cariomorfos. Estes resultados sugerem fortemente que os indivíduos dos três cariomorfos diferentes provavelmente não hibridizam na população examinada, o que sugere a presença de três espécies distintas (conceito biológico de espécie) facilmente diagnosticada por números diferentes de cromossomos diplóides e de outros marcadores cromossômicos.

Introdução

O gênero *Astyanax* é um dos mais diversificados entre os peixes neotropicais, com uma taxonomia muito complexa não só por causa da extensa diversificação morfológica, mas também porque um grande número de espécies parece formar um “complexo de espécies” com baixa diferenciação morfológica, mas alta variação em outros níveis, como é verificado ocorrer com relação ao número e morfologia dos cromossomos (Morelli et al. 1983). A existência de um “complexo de espécies” foi inicialmente sugerida por Moreira-Filho e Bertollo em *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo 1991), do mesmo modo que outros casos são também observados em peixes neotropicais como *Corydoras aeneus* (Turner et al. 1992), *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al. 1997), *Gymnotus carapo* (Mihomem et al. 2008).

Astyanax fasciatus (Curvier, 1919) é outra espécie que apresenta indicações de constituir um “complexo de espécies”, já que informações disponíveis apontam a existência de diferentes cariomorfos com números diplóides de 45, 46, 47, 48 e 50 cromossomos (Tabela 1). O cariótipo mais frequentemente citado na literatura para esta espécie apresenta $2n=48$ (Tabela 1), mas a distribuição geográfica mais conhecida é frequentemente representada por indivíduos com números diplóides de 46 e 50 cromossomos (Figura 1).

Tabela 1. Número de cromossomos em indivíduos de populações que compreendem o complexo de espécies *Astyanax fasciatus*.

Espécies originalmente descritas	Rio/bacia hidrográfica	Nº de cromossomos	Referências
<i>A. fasciatus</i>	Mogi Guaçu river/Paraná basin	45	14
<i>A. fasciatus</i>	Mogi Guaçu river/Paraná basin	46	2,4,9,10,11,18
<i>A. fasciatus</i>	Mogi Guaçu river/Paraná basin	47	14,11
<i>A. fasciatus</i>	Mogi Guaçu river/Paraná basin	48	11,18
<i>A. fasciatus</i>	Piracicaba river/Paraná basin	48	7
<i>A. fasciatus</i>	Piracicaba river/Paraná basin	46	23
<i>A. fasciatus</i>	Tietê river/Paraná basin	46	5
<i>A. fasciatus</i>	Riacho Águas da Madalena/Paraná basin	50	23
<i>A. fasciatus</i>	Águas da Madalena stream/Paraná basin	48	23
<i>A. fasciatus</i>	Águas da Madalena stream/Paraná basin	46 ★	23
<i>A. fasciatus</i>	Paranapanema river/Paraná basin	46	6
<i>A. fasciatus</i>	Paranapanema river/Paraná basin	50 ★	13
<i>A. fasciatus</i>	Paraíba river/Paraná basin	48	3,5,9
<i>A. fasciatus</i>	Paiol Grande river/Paraná basin	48	9,17
<i>A. fasciatus</i>	Barra funda river/Paraná basin	46	9
<i>A. fasciatus</i>	Passa Cinco river/Paraná basin	46	9,11
<i>A. fasciatus</i>	Sapucaí river/Paraná basin	48	12
<i>A. fasciatus</i>	Araguari river/Paraná basin	46	16
<i>A. cf. fasciatus</i>	Juquiá river/Paraná basin	48	2
<i>A. fasciatus</i>	Meia Ponte river/Araguaia-Tocantins basin	46	1
<i>A. fasciatus</i>	Córrego Fundo stream/Araguaia-Tocantins basin	50	8
<i>A. aff. fasciatus</i>	Araras river/Paraná basin	48	22
<i>A. fasciatus</i>	Patos river/Paraná basin	48	22
<i>A. fasciatus</i>	Três Bueiros river/Paraná basin	48	22
<i>A. fasciatus</i>	Almas river/Paraná basin	48	22
<i>A. aff. fasciatus</i>	Tibagi river/Paraná basin	48	19
<i>A. aff. fasciatus</i>	Tibagi river/Paraná basin	49	19
<i>A. aff. fasciatus</i>	Tibagi river/Paraná basin	50	19
<i>A. fasciatus</i>	São Francisco river/São Francisco basin	48	7,9,17,22
<i>A. fasciatus</i>	São Francisco river/São Francisco basin	46	7
<i>A. fasciatus</i>	Três Marias/São Francisco Basin	46	15
<i>A. fasciatus</i>	Contas river/Leste Basin	48 ★	21
<i>A. fasciatus</i>	Mineiro do Costa stream/Leste Basin	48	21
<i>A. fasciatus</i>	Preto do Costa river/Leste Basin	48	21

Referências: 1. Jim and Toledo (1975); 2. Morelli et al. (1983); 3. Moreira-Filho and Bertollo (1986); 4. Paganelli (1990); 5. Justi et al. (1990); 6. Reganham and Giuliano-Caetano (1990); 7. Justi (1993); 8. Centofante and Venere (1995); 9. Heras and Moreira-Filho (1996); 10. Daniel-Silva (1996); 11. Heras and Moreira-Filho (1997); 12. Swerts et al. (1998); 13. Vale and Martins-Santos (1999); 14. Daniel-Silva and Almeida-Toledo (2001); 15. Moreira-Filho et al. (2001); 16. Torres-Mariano and Morelli (2006); 17. Abel et al. (2006); 18. Pazza et al. (2006); 19. Artoni et al. (2006); 21. Medrado et al. (2008); 22. Peres et al. (2009); 23. Ferreira-Neto et al. (presente estudo).

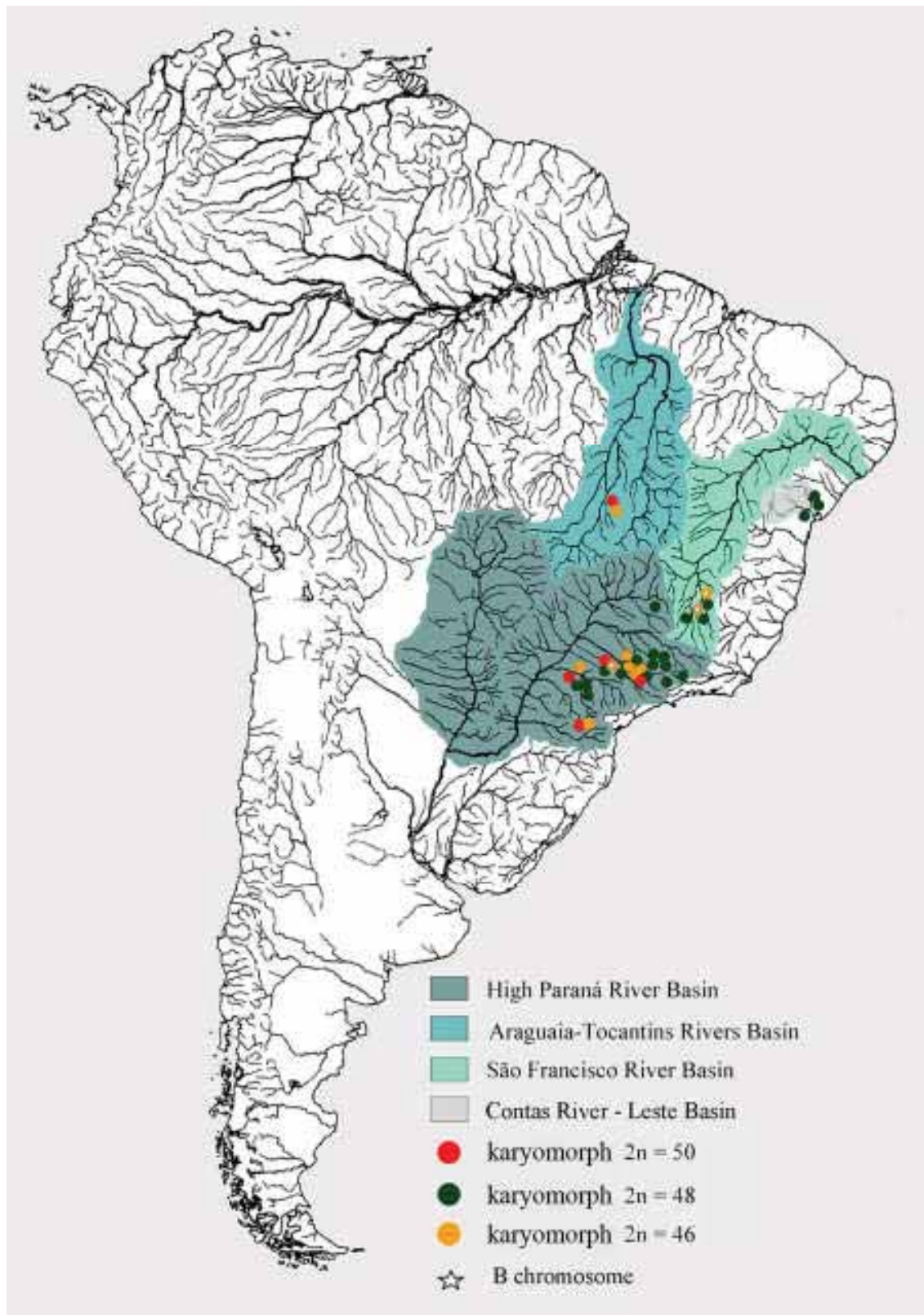


Figura 1. Mapa da América do Sul destacando a bacia hidrográfica dos rios Paraná, Araguaia-Tocantins, Contas e São Francisco. A distribuição natural de *A. fasciatus* e a ocorrência de indivíduos portadores de cromossomos B encontram-se indicadas no mapa e representadas de acordo com a legenda.

Cromossomos B são elementos supranumerários relatados no cariótipo de várias espécies de *Astyanax* (Moreira-Filho et al. 2004). Em *A. fasciatus*, a ocorrência de cromossomos B já foi relatada apenas para o cariomorfo com 46 cromossomos, em representantes de uma população da bacia do São Francisco (Moreira-Filho et al. 2001).

Neste estudo foram analisadas as evidências dos indivíduos portadores dos cariomorfos com $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos, examinando um número elevado de indivíduos que vivem em simpatria. A ausência de números cromossômicos intermediários, a restrição de ocorrência de cromossomos B apenas para o cariomorfo $2n=46$ e a ausência de heteromorfismo para os sítios de rDNA 18S, que apresenta diferença entre alguns cariomorfos e o fato dos exemplares com estes cariomorfos não se hibridizarem sugerem fortemente a possibilidade da existência de três espécies distintas, ainda consideradas sob a mesma identificação nominal de *Astyanax fasciatus*.

Materiais e métodos

Noventa amostras simpátricas e sinóticas de *A. fasciatus* (56 fêmeas e 34 machos), coletados no córrego Água da Madalena, Botucatu, SP, Brasil ($22^{\circ} 59'23''\text{S}$ $48^{\circ} 25'31''\text{W}$) foram analisados. Após a retirada de amostras de tecidos para realização das preparações cromossômicas e aplicação dos protocolos de biologia molecular, os espécimens foram fixados em formol 10% e preservados em álcool 70% e, após a identificação taxonômica, foram depositados no Museu de Biologia e Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Preparações cromossômicas e bandejamento

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células da porção anterior do rim utilizando a técnica de secagem convencional ao ar segundo protocolo seguido por Foresti et al. (1981). A análise da

heterocromatina constitutiva (bandas C) seguiu o procedimento básico proposto por Sumner (1972), com pequenas adaptações e a localização das NORs foi realizada pela técnica de coloração com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980).

O mapeamento de sítios de genes ribossomais 18S e 5S em cromossomos metafásicos foi realizado utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986), com adaptações. A sonda de DNAr 18S foi obtida a partir do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e a sonda de DNAr 5S, a partir de *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). A sonda 18S foi marcada com biotina dATP 14 por PCR (Polymerase Chain Reaction), seguindo as instruções do fabricante (Bionick Sistema de Etiquetagem - Invitrogen). A marcação decorrente da hibridação foi detectada com avidina-FITC e os sinais amplificados com anti-avidina biotinilada. A sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Sciences) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados com anti-digoxigenina rodamina.

Os cromossomos metafásicos foram contrastados com DAPI e analisados em microscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando o programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecido por Levan et al. (1964), que foram classificados como cromossomos metacêntrico (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), sendo dispostos no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

A análise citogenética de 90 exemplares de *Astyanax fasciatus* coletados no córrego Água da Madalena revelou a presença de três cariomorfos, tendo sido identificados exemplares com $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos (Tabela 2 e Figuras 2a, 2c e 2e), com números fundamentais de 84, 86 e 90, respectivamente. O sexo anatômico dos peixes, determinado por exame visual das gônadas, não foi associado com as diferenças cariotípicas,

sendo que machos e fêmeas foram encontrados com os três citótipos citados.

Curiosamente, todos os espécimens com cariomorfo $2n=46$ mostraram a presença de um macrocromossomo supranumerário ou B mitoticamente estável (Figuras 2a, 2b), que não estava presente nos espécimens que apresentaram os cariomórfos com 48 e 50 cromossomos. Não foram encontrados indivíduos com números cromossômicos intermediários na amostra estudada.

O mapeamento físico do DNAr mostrou uma característica de conservação notável quanto à localização dos sítios de DNAr 5S, presentes em dois pares cromossômicos de números 3 e 20 nos cariomorfos com 46 e 48 cromossomos e nos pares 13 e 21 no cariomorfo com 50 cromossomos (Figuras 2b, 2d, 2f). A aplicação da técnica de coloração das regiões organizadoras de nucléolo pela prata revelou, em todas as células, a presença de marcação Ag-NOR em dois pares de cromossomos do tipo submetacêntrico nos três cariomorfos. Uma Ag-NOR foi localizada na região distal do braço curto e outro no braço longo (Figuras 2b, 2d, 2f). A análise por FISH demonstrou a presença de DNAr 18S nas regiões distais de cinco pares cromossômicos em todos os cariomorfos encontrados, não sendo evidenciadas marcações por FISH nos braços curtos de qualquer cromossomo (Figuras 2b, 2d, 2f). Tal fato poderia ser indicativo da inexistência de tais genes nestes sítios cromossômicos ou que, devido à existência de sequências muito pequenas destes genes, sua detecção seria dificultada. A utilização de doble FISH demonstrou a presença do par cromossômico número 20 nos cariomorfos com 46 e 48 cromossomos, como portador de ambos tipos de DNAr, estando os genes para 5S localizados no braço curto e para 18S no braço longo (Figuras 2b, 2d). No cariomorfo com 50 cromossomos, estes genes não se encontram em sintenia (Figura 2f). Todos os espécimens analisados por FISH mostraram que os cromossomos do par número 20, que carregas ambos os tipos de DNAr, não apresentaram diferenças de morfologia, sendo aparentemente homomórficos. Notavelmente, o mapeamento de FISH mostrou a presença de um cluster de DNAr 18S em região intersticial do braço longo do cromossomo B encontrado no cariomorfo $2n=46$. No entanto, este cluster de DNAr nunca foi detectado pela coloração com Prata.

Tabela 2. Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus*, mostrando a composição cariotípica e localização de sítios de DNAr 5S e 18S nos cromossomos dos indivíduos analisados.

Citótipos 2n / NF	Número de espécimens		rDNA 5S/18S localização (pares)	Número de Cromossomos B		NOR (pares)
	fêmeas	fórmula		fêmeas	machos	
<i>2n</i> = 46, <i>NF</i> =84	12	5m+8sm+6st+4a	3, 20 8,15,16,20,21,B	1	1	9,10
	10					
<i>2n</i> = 48, <i>NF</i> =86	10	5m+8sm+6st+5a	3, 20 8,12,19,20,21	0	0	9,10
	9					
<i>2n</i> = 50, <i>NF</i> =84	41	5m+8sm+4st+8a	3,21 5,8,12,18,22	0	0	9,10
	32					

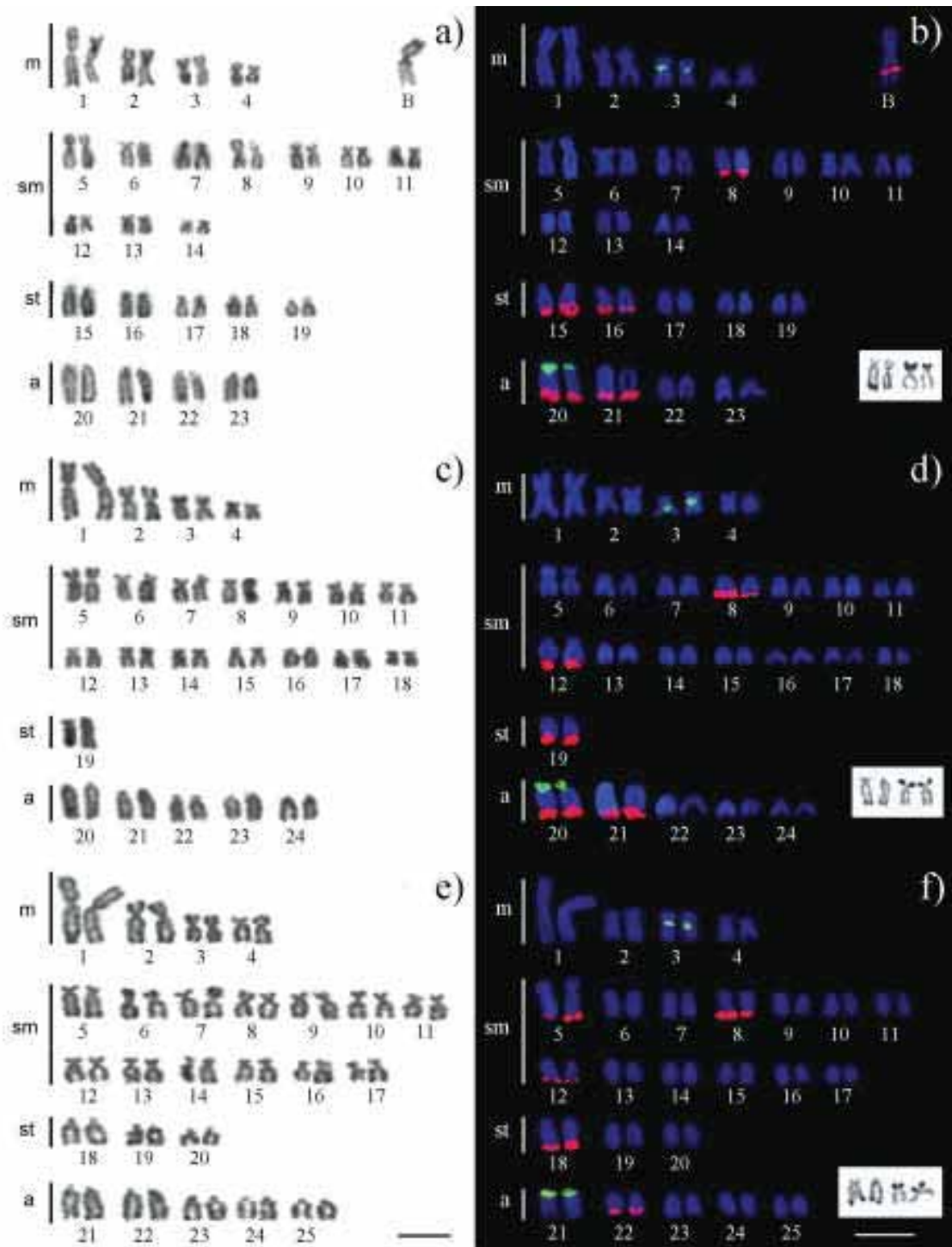


Figura 2. Cariótipos de *Astyanax fasciatus* (cariomorfos com 46, 48 e 50 cromossomos), após coloração convencional com Giemsa (a, c, e) e double FISH usando sondas de DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho). Os cromossomos com Ag-RONs estão em destaque nos box em b, d, f. Barra = 10µm.

Discussão

A ocorrência de citótipos em simpatria e sintopia parece não ser um fenômeno tão raro em peixes e tem sido relatada em diferentes espécies de *Astyanax*, como *A. scabripinnis* (Souza e Moreira-Filho 1995) e *A. fasciatus* (Pazza et al. 2006, 2008). Uma revisão sobre todos os dados publicados para *A. fasciatus*, que se encontra resumida na Tabela 1 e na Figura 1, dão indicações de que os números cariotípicos relatados para os três cariomorfos descritos no presente trabalho possuem ampla distribuição, sendo que a simpatria pode ser observada em pelo menos dois cariomorfos em quatro diferentes bacias hidrográficas brasileira, no Alto Paraná, Araguaia-Tocantins, Contas e São Francisco, embora nestes casos, o número de cromossomos B mostrou variação entre os indivíduos (Justi 1993, Heras e Moreira-Filho 1997, Moreira-Filho et al. 2001).

Uma evidência no apoio a eventos de hibridação entre cariomorfos foi relatada por Artoni et al. (2006), que encontraram no rio Tibagi um exemplar com 49 cromossomos, que poderia ser resultado da hibridação entre indivíduos portadores de citótipos com 48 e 50 cromossomos (Bacia do Alto rio Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil). Evidências que suportam a hibridação entre cariomorfos foram relatadas também por Pazza et al. (2006, 2008), que identificaram cariomorfos com 45, 46, 47 e 48 cromossomos em indivíduos capturados ao longo do rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto rio Paraná, Cachoeira das Emas, São Paulo, Brasil). Neste caso, o cariomorfo com 47 cromossomos poderia ter resultado da hibridação entre os citótipos 46 e 48, enquanto que a presença de três exemplares com 45 cromossomos permite sugerir a possível existência de um cariomorfo não estudado, com 44 cromossomos neste rio.

Investigações sobre a presença e distribuição de DNAr em espécies de *Astyanax* podem ser muito úteis para inferir a origem do cromossomo B. Para este fim, uma comparação de sequências de DNAr entre os cromossomos A e B de várias espécies poderia ser muito informativa. A coloração de cromossomos metafásicos pela Prata revela apenas as NORs que estavam ativas na intérfase anterior (Hsu et al., 1975) e parece que o DNAr 18S contido no cromossomo B é geralmente inativo. A inatividade do DNAr parece, assim,

constituir-se numa característica generalizada dos cromossomos B, como já foi relatado ocorrer em várias espécies filogeneticamente distantes, incluindo o gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, Charpentier 1825 (Cabrero et al. 1997, Bakkali et al. 2001), o rato preto *Rattus rattus*, Linnaeus 1758 (Stitou et al. 2000) e os peixes *Haplochromis obliquidens*, Hilgendorf 1888 (Poletto et al. 2010). No entanto, a presença de genes ativos de DNAr têm sido ocasionalmente relatada em alguns cromossomos B de espécies como o gafanhoto *E. plorans* (Teruel et al. 2007, 2009) e os roedores *Akodon montensis*, Thomas 1913 e *Orzomys angouya*, Fischer 1814 (Silva et al. 2004). A ocorrência e identificação de maior número de clusters de DNAr detectados por FISH do que o número de NORs coradas por Prata sugere que alguns sítios de DNAr poderiam estar inativos na maioria das células, sendo necessário e interessante verificar se esse fenômeno é facultativo ou constitutivo. O fato de que o nitrato de Prata pode também se ligar a outras proteínas presentes no núcleo das células, implicaria reconhecer que algumas regiões visualizadas nos cromossomos com reação positiva à prata poderiam, na verdade, não corresponder a genes ribossomais (Dobigny et al., 2002). A detecção de um maior número de genes ribossomais quando se usa FISH com sondas de DNA 18S ou 28S, em relação ao número obtido com o uso de coloração por nitrato de Prata é um resultado comum, que já foi relatado em *Astyanax scabripinnis* (Ferro et al. 2001), *Salmo trutta* (pendás et al. 1993), *Colossoma macropomum*, Curvier 1816, *Piraractus brachypomus*, Curvier 1818 e seus híbridos interespecíficos (Nirchio et al. 2003), *Hyphessobrycon anisitsi*, Eigenmann 1907 (Centofante et al. 2003), *Prochilodus lineatus*, Valenciennes (Jesus e Moreira-Filho 2003) e *Lebias fasciata*, Valenciennes 1821 (Tigano et al. 2004). Portanto, o par de cromossomos que realmente se apresenta como portador da região organizadora de nucléolo é provavelmente o primeiro par submetacêntrico, aquele que mostra os dois sinais por FISH e coloração por nitrato de Prata.

A presença de um cromossomo B em todos os 22 indivíduos com cariomorfo $2n=46$ é intrigante, já que parte da variação inter-individual caracteriza o cromossomo B (Camacho 2005). Por outro lado, Moreira-Filho et al. (2001) relataram a presença de cromossomos B com variação interindividual

em cerca de 10% da população da amostra analisada, na bacia do rio São Francisco. Isto sugere que *A. fasciatus* do ribeirão Água da Madalena do presente trabalho pode estar em um estado de estabilização. Com a completa eliminação através de um sexo e de acionamento completo através do outro, a dinâmica populacional do cromossomo B em *Astyanax* lembra o caso da linha germinal de cromossomos restritos no tentilhão (Itoh et al. 2009). O mecanismo por trás da estabilização do cromossomo B em populações do córrego Água da Madalena parece, portanto, ser bastante complexa e sua elucidação requer ainda mais dinâmica populacional e estudos cromossômicos de transmissão. A presente análise de uma grande amostra de indivíduos capturados no mesmo ribeirão, mostra a ocorrência de três cariomorfos sintópicos de *A. fasciatus* com números cromossômicos de $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$.

A ausência de formas cromossômicas intermediárias, a presença de cromossomos B em apenas um desses cariomorfos ($2n=46$) e a ausência de heteromorfismo aparente para o cromossomo 20, sugere que os três cariomorfos não hibridizam neste fluxo. Neste caso, os dados apontam em direção à possibilidade de que estes três cariomorfos na verdade correspondem a três espécies crípticas, apoiando assim a hipótese de que *A. fasciatus* é na verdade um complexo de espécies, ou seja, várias espécies foram incluídas sob o nome de *A. fasciatus* (Artoni et al. 2006).

O cromossomo B encontrado em *A. fasciatus* é grande e metacêntrico. Curiosamente, as duas características parecem comuns a todos os cromossomos B descritos em *Astyanax*, incluindo *A. scabripinnis* (Salvador e Moreira-Filho 1992, Maistro et al. 1992, Souza e Moreira-Filho 1995, Vicente et al. 1996, Mizoguchi e Martins-Santos 1997, Vicari et al. 2010, 2011), *A. eigenmanniorum*, Cope 1894 (Fauaz et al. 1994), *A. schubarti*, Britski 1964 (Moreira-Filho 2001), *A. fasciatus* (Moreira-Filho 2001) e *A. bockmanni*, Vari e Castro 2007 (Daniel comunicação pessoal). Tal semelhança morfológica apoiaria a hipótese de uma origem comum dos cromossomos B em *Astyanax* (Moreira-Filho et al. 2001). No entanto, mostramos aqui, pela primeira vez, a presença de rDNA intersticialmente localizado no braço p do cromossomo B em indivíduos de *A. fasciatus*. A aparente ausência de rDNA no braço q parece

incompatível com a origem de isocromossomos previamente sugerido por alguns desses Bs, como em *A. scabripinnis* (Mestriner et al. 2000). No entanto, a presença de uma pequena quantidade de genes de rDNA também é possível.

APÊNDICE

Figura 1: Sequências de DNA mitocondrial (gene COI) utilizadas na discriminação de cariomorfos de *Astyanax fasciatus*.

```
>Astyanax_fasciatus 2n=46
GTGGCAATCACCCTGCTGATTCTTTCTACTAATCATAAAGACATCGGCACCCTTTATCTA
GTATTTGGTGCTGAGCTGGGATGGTTGGAAGTCTCTAAGCCTATTAAATCGGGCAGAG
CTTGGCCAGCCAGGATCCCTTCTAGGCGATGACCAGGTATAT AATGTTCTGGTAAACGCA
CATGCTTTTGTAAATAATCTTCTTATAGTTATGCCTGTAAATGATTGGGGGCTTTGGAAT
TGACTTGTACCACTTATAATTGGTGCCCCAGACATGGCTTCCCACGAATAAATAACATA
AGTTTCTGACTGCTTCCCCATCTTTCTTCTCCTTCTAGCATCATCTGGCGTAGAAGCT
GGGGCGGGGACAGGTTGAACTGTTTACCCCTCTTGCTGGGAACCTTGACACGACAGGG
GCCTCCGTGGACCTTACAATCTTCTCACTTCACTAGCTGGTGTCTTCAATCTTAGGA
GCAATCAACTTCATTACAACCATTTAAACATAAAACCCAGCCATCTCACAATAACAA
ACAACCTCTATTTGTCTGGGCGTTCTCATTACAGCTGTCTCTCTCTTCTATCCCTCCCT
GTCTTAGCAGCCGGCATTACTATACTCTTACAGACCGTAACCTTAACACTTCATTTTT
GACCCTGCAGGAGGTGGAGACCCCATCTTTATCAACAACCTATTCTGATTCTTTGGACAC
CCCGAAGTATACATTTAATTTAACAGGCTTTGGAATGATTCCCATATCGT

>Astyanax_fasciatus 2n=48
GTGGCAATCACCCTGCTGATTCTTTCTACTAATCATAAAGACATCGGCACCCTTTATCTA
GTATTTGGTGCTGAGCTGGGATGGTTGGAAGTCTCTAAGCCTATTAAATCGGGCAGAG
CTTGGCCAGCCAGGATCCCTTCTAGGCGATGACCAGGTATAT AATGTTCTGGTAAACGCA
CATGCTTTTGTAAATAATCTTCTTATAGTTATGCCTGTAAATGATTGGGGGCTTTGGAAT
TGACTTGTACCACTTATAATTGGTGCCCCAGACATGGCTTCCCACGAATAAATAACATA
AGTTTCTGACTGCTTCCCCATCTTTCTTCTCCTTCTAGCATCATCTGGCGTAGAAGCT
GGGGCGGGGACAGGTTGAACTGTTTACCCCTCTTGCTGGGAACCTTGACACGACAGGG
GCCTCCGTGGACCTTACAATCTTCTCACTTCACTAGCTGGTGTCTTCAATCTTAGGA
GCAATCAACTTCATTACAACCATTTAAACATAAAACCCAGCCATCTCACAATAACAA
ACAACCTCTATTTGTCTGGGCGTTCTCATTACAGCTGTCTCTCTCTTCTATCCCTCCCT
GTCTTAGCAGCCGGCATTACTATACTCTTACAGACCGTAACCTTAACACTTCATTTTT
GACCCTGCAGGAGGTGGAGACCCCATCTTTATCAACAACCTATTCTGATTCTTTGGACAC
CCCGAAGTATA

>Astyanax_fasciatus 2n=50
GTGGCAATCACCCTGCTGATTCTTTCTACTAATCATAAAGACATCGGCACCCTTTATCTA
GTATTTGGTGCTGAGCTGGGATGGTTGGAAGTCTCTAAGCCTATTAAATCGGGCAGAG
CTTGGCCAGCCAGGATCCCTTCTAGGCGATGACCAGGTATAT AATGTTCTGGTAAACGCA
CATGCTTTTGTAAATAATCTTCTTATAGTTATGCCTGTAAATGATTGGGGGCTTTGGAAT
TGACTTGTACCACTTATAATTGGTGCCCCAGACATGGCTTCCCACGAATAAATAACATA
AGTTTCTGACTGCTTCCCCATCTTTCTTCTCCTTCTAGCATCATCTGGCGTAGAAGCT
GGGGCGGGGACAGGTTGAACTGTTTACCCCTCTTGCTGGGAACCTTGACACGACAGGG
GCCTCCGTGGACCTTACAATCTTCTCACTTCACTAGCTGGTGTCTTCAATCTTAGGA
GCAATCAACTTCATTACAACCATTTAAACATAAAACCCAGCCATCTCACAATAACAA
ACAACCTCTATTTGTCTGGGCGTTCTCATTACAGCTGTCTCTCTCTTCTATCCCTCCCT
GTCTTAGCAGCCGGCATTACTATACTCTTACAGACCGTAACCTTAACACTTCATTTTT
GACCCTGCAGGAGGTGGAGACCCCATCTTTATCAACAACCTATTCTGATTCTTTGGACAC
CCCGAAGTATACATTTAATTTAACAGGCTTTGGAATGATTCCCATATCGTGCCTAT
TATTCGGGCAAAAAGAA
```

Capítulo 2

Pintura cromossômica sugere uma origem interespecífica para o cromossomo B em *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae).

Maressa Ferreira Neto, Roberto Ferreira Artoni, Marcelo Ricardo Vicari, Orlando Moreira Filho, Juan Pedro M. Camacho, Mohammed Bakkali, Claudio de Oliveira, Fausto Foresti - Chromosome painting suggests the interspecific origin of a B chromosome in *Astyanax fasciatus*

Abstract

Chromosome studies were performed in a population of *Astyanax fasciatus* from the stream of Água da Madalena. Chromosome spreads were subjected to base-specific fluorochrome staining, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with histone H3 and H4 probes and with a pool of probes microdissected from the B chromosome found in this species. The studied population contained three different karyomorphs, with $2n=46$, 48 and 50 chromosomes. Conservation of chromosomal patterns for all markers analyzed in each of these three karyomorphs, and the absence of evidence in support of interbreeding events, suggests that *A. fasciatus* is a species complex and that the three karyomorphs studied here are likely three separate biological entities with common and recent origin. The occurrence of B chromosomes only in the karyomorph with $2n=46$ further supports the species complex hypothesis, and the fact that all $2n=46$ individuals carried exactly one B chromosome indicates the stable status of this chromosome in this karyomorph. Chromosome painting with DNA probes generated by microdissection of the B chromosome showed almost complete hybridization with the B chromosome, but not a single visible signal on any of the standard chromosomes. This points to an interspecific origin of this B chromosome.

Resumo

Estudos cromossômicos foram realizados em amostras de *Astyanax fasciatus* capturados no ribeirão Água da Madalena. Preparações cromossômicas foram submetidas à base de coloração fluorocromo específica, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas para histonas H3 e H4 e com um conjunto de sondas microdissecadas a partir do cromossomo B encontrado nesta espécie. A amostra de indivíduos estudada continha três cariomorfos diferentes, com 46, 48 e 50 cromossomos. A conservação dos padrões cromossômicos para todos os marcadores analisados em cada um destes três cariomorfos e a ausência de evidências em apoio à ocorrência de eventos intercruzantes sugerem que *A. fasciatus* constitui um complexo de espécies e que os três cariomorfos aqui estudados reforçam a idéia da existência de três entidades biológicas distintas, com origem comum e recente. A ocorrência de cromossomos B somente no cariomorfo com 46 cromossomos suporta a hipótese da existência do complexo de espécies e o fato de que todos os indivíduos portadores deste cariótipo sejam portadores de exatamente um cromossomo B indica o estado estável deste cromossomo neste cariomorfo. Pintura cromossômica com sondas de DNA gerados por microdissecação do cromossomo B mostraram a hibridação quase completa com o cromossoma B, mas nenhum sinal visível de associação com qualquer dos cromossomos do lote padrão. Tais evidências parecem apontar para uma origem interespecífica do cromossomo B nesta espécie.

Introdução

Cromossomos dos organismos eucariontes contêm geralmente uma variedade de blocos de DNA repetitivos, com unidades de repetição de tamanhos diferentes que podem ser representados até dezenas de milhares de vezes nos cromossomos, representando uma grande porção do genoma eucariótico (Taft et al. 2007). As unidades que constituem o DNA repetitivo podem ser encontradas dispostas em tandem, em aglomerados ou de forma dispersa no genoma. As sequências de DNA repetidas em tandem não são sempre transcricionalmente inertes e incluem algumas famílias multigênicas, tais como genes de histonas e RNA ribossomal (Maxson et al. 1983; Hadjiolov, 1985). No caso de histonas, cinco tipos de genes estão geralmente

colocalizados na mesma região cromossômica, formando um aglomerado (Graham, 1995).

Sondas para elementos de DNA repetitivos, tais como o DNA satélite, DNA ribossomal (rDNA) e os genes para histonas têm sido frequentemente utilizados para uma variedade de análises do cariótipo, que representam uma ferramenta interessante para a identificação cromossômica nos estudos de evolução do genoma. A sua localização nos cromossomos é útil uma vez que permite a identificação e caracterização físico-funcional de regiões genômicas específicas. No caso de espécies estreitamente relacionadas, o uso destes elementos repetitivos como marcadores cromossômicos permite desvendar eventos cromossômicos causadores de rearranjos estruturais e numéricos que possam ter ocorrido durante ou após eventos de especiação. A pintura intra-cromossômica, usando sondas obtidas por microdissecção, foi recentemente utilizada para estudar a evolução cromossômica em peixes Neotropicais (De Henning et al. 2008, Pansonato-Alves et al. 2011A).

Duas principais hipóteses foram sugeridas para explicar a origem dos cromossomos B. Um deles reivindica que os cromossomos B surgiram a partir do genoma do mesmo hospedeiro onde são observados (hipótese intra-específica). A outra sugere que os cromossomos B poderiam ter se originado a partir dos cromossomos de uma espécie diferente, como resultado da ocorrência de hibridação interespecífica e de introgressão conseqüente do cromossomo neo-B no genoma de uma nova espécie. Evidências que reforçam estas hipóteses foram formuladas e discutidas por Camacho (2005).

Uma das melhores maneiras de testar a origem cromossomo B é analisar similaridades de seqüências de DNA entre os cromossomos B e os cromossomos do lote padrão (A) das espécies. Similaridade alta está prevista para cromossomos B de origem intraespecífica e baixa para aqueles cuja origem representa outras espécies. A análise da similaridade de seqüências é um processo demorado, sendo necessário aplicar uma abordagem mais holística. Neste sentido, um método profusamente utilizado nos últimos anos consiste na microdissecção de cromossomos específicos, a geração de sondas de DNA a partir do cromossomo microdissectado e a utilização destas sondas específicas para a hibridação *in situ* com cromossomos do complemento padrão (A),

utilizando a técnica denominada de pintura cromossômica. Esta técnica foi empregada pela primeira vez para os cromossomos B por McQuade et al. (1994) e forneceu resultados interessantes em uma variedade de organismos (para revisão, ver Camacho 2005).

A produção de sondas por microdissecção do cromossomo B e posterior amplificação de primers degenerados por PCR (DOP-PCR), foi aplicada no estudo de diferentes ciclídeos africanos (Yoshida et al., 2011). Contudo, este tipo de análise é ainda muito pouco aplicada em peixes. Estudos interessantes entre os poucos exemplos existentes constitui o uso de sondas de DNA repetitivo para identificar a origem dos cromossomos B a partir da formação de um isocromossomo em *A. scabripinnis* (Mestriner et al, 2000; Vicari et al, 2011) e também para determinar a origem dos cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* (Artoni et al. 2006; Voltolim et al. 2010). Pode ser também destacada a utilização de sondas específicas de cromossomos B, inferidas a partir de resultados de polimorfismo de AFLP mostrando que o cromossoma B de *Alburnus Alburnus* é rico em elementos específicos de DNA retrotransponíveis e possivelmente originado a partir de uma fusão entre dois cromossomos do lote A da mesma espécie (Ziegler et al, 2003; Schmid et al; 2006).

A coloração por fluorocromos combinada com hibridação fluorescente *in situ* de sondas de histonas, bem como a pintura cromossômica utilizando um conjunto de sondas obtidas por microdissecção do cromossomo B de *Astyanax fasciatus* foram utilizadas no presente trabalho, no sentido de analisar comparativamente a localização cromossômica destes marcadores entre os três cariomorfos encontrados na amostra de peixes aqui analisados. O objetivo principal destas análises foi o de revelar as inter-relações entre os três cariomorfos encontrados localmente no complexo de espécies *A. fasciatus* e inferir a possível origem do cromossomo B encontrada no cariomorfo com 46 cromossomos.

Material e Métodos

Noventa indivíduos de *A. fasciatus* (56 fêmeas e 34 machos) foram coletados no córrego Água da Madalena, Botucatu, SP, Brasil (22 ° 59'23 "S 48° 25'31" W). Preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células de rim anterior, utilizando

a técnica convencional de secagem ao ar (Foresti et al. 1981). Os peixes foram fixados em formol a 10%, conservados em álcool 70% e, após a identificação, depositados no Museu de Biologia do Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Regiões GC-ricas dos cromossomos foram identificadas através do fluorocromo Cromomicina A3 seguindo o procedimento descrito por Schweizer (1976). O mapeamento físico dos locais onde estão localizados os genes para histonas H3 e H4 foi realizado utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), em conformidade com o procedimento estabelecido por Pinkel et al. (1986), com as adaptações descritas em (Ferreira-Neto et al, 2012; Ferreira-Neto et al, 2010). Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi usada para rotular a sonda H3 com biotina dATP-14, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Sistema de Etiquetagem - Invitrogen). Os sítios de hibridação da sonda cromossômica foram revelados usando avidina-FITC e os sinais foram amplificados com anticorpos anti-avidina biotinizados. A PCR foi também utilizada para gerar a sonda H4 marcada com digoxigenina H4-11 dUTP (Roche Applied Sciences). Neste caso, os sinais de hibridação foram detectados com anticorpos anti-digoxigenina rodamina.

A microdissecação cromossômica foi realizada a partir de preparações obtidas de suspensões de células de *A. fasciatus* utilizando um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss) e um micromanipulador (5171 - Eppendorf), ao qual foi acoplada uma micro-agulha de vidro produzida no puxador de agulhas Narishige PC-10. Para identificação inequívoca dos cromossomos B para microdissecação, a suspensão celular foi gotejada sobre lamínulas de vidro e, em seguida, submetida ao bandamento-C (Sumner 1972), seguida de coloração com Giemsa a 5% durante 2 minutos. Metáfases de boa qualidade foram utilizadas e o cromossomo B foi facilmente identificado graças à sua morfologia e sua natureza, que se mostrou quase completamente heterocromático (Figura 2, Box).

Para a amplificação do material genético, cinco cromossomos B foram microdissecados e transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 9µl da mistura oligonucleótido Primer Degenerado PCR (DOP-PCR) (1µl de Termosequenase tampão 1X, dNTP a 1µl 2mM, 2µl de primer DOP - 5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3' (Telenius et al. 1992) a 10 mM e 5 mL de água). O tubo de microcentrífuga foi aquecido a 90° C durante 10 minutos para

desnaturação inicial; em seguida, 1µL de Termosequenase (USB) em (10U/µL) foi adicionado antes do início dos ciclos de amplificação, que foi realizado do seguinte modo: três minutos a 94 ° C, 35 ciclos de 90 segundos a 90 ° C, 90 segundos a 52 ° C e 90 segundos a 72 ° C, seguido por um ciclo de cinco minutos a 72 ° C. Após hibridação fluorescente *in situ*, os cromossomos foram contrastados com DAPI e analisados sob microscópio de luz (Olympus BX61). As imagens foram capturadas com o uso do programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Para construir os kariogramas, a morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com os limites estabelecidos pela relação de braços descrita por Levan et al. (1964). Os cromossomos de cada kariomorfo foram então classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) ou acroicêntrico (a), e foram dispostos em ordem decrescente de tamanho na organização dos kariótipos.

Resultados e Discussão

A detecção das regiões nucleolares pelo fluorocromo CMA3+ revelou a presença de marcação em dois pares de cromossomos submetacêntricos, sendo distal no braço longo de um par e distal no braço curto do outro (Figuras 2b,d,f). Este padrão coincide com a localização das regiões organizadoras de nucléolos ativas (NORs) identificadas pela técnica de Ag-NORs, reportados anteriormente para estes três kariomorfos (Ferreira-Neto et al. 2012). Além disso, a coloração CMA3 resultou numa grande, embora pouco consistente, banda CMA3+ na região pericentromérica do cromossomo B, ocupando cerca de metade do comprimento deste cromossomo (Figura 2b). Uma parte da banda CMA3+ localizada no braço longo do cromossomo B coincide com um sinal de hibridação *in situ* com a sonda de rDNA18S, como mostrado anteriormente por Ferreira-Neto et al. (2012), mas este parece ser um sítio de DNAr inativo, uma vez que nenhum sinal de coloração de prata foi observado no cromossomo B. Os três kariomorfos mostraram padrões idênticos de CMA3+, da mesma forma como ocorreu para a impregnação por Prata (Ferreira-Neto et al. 2012), indicando uma alta similaridade estrutural e funcional entre os três kariomorfos para a expressão dos sítios de DNAr, o que seria coerente com uma divergência muito recente dos três kariomorfos.

Tem sido verificado que regiões cromossômicas bandas CMA3+, que se apresentam fortemente brilhantes, são GC-ricas (Schmid et al., 1980). Assim, sítios específicos para genes como de RNAr contém tais sequências, embora a relação das regiões CMA3+ GC-ricos não seja estrita (Artoni et al., 1999).

Sinais de FISH após hibridação com sondas de H3 e H4 mostraram a presença destes dois aglomerados de genes no braço curto do cromossomo submetacêntrico 9 (Figuras 2a, c, e). Um cluster adicional contendo marcação para H4, mas não de sequências H3 foi localizado no cromossomo 3. Não foram detectados sinais de FISH para H3 ou H4 no cromossomo B, sugerindo que este cromossomo não apresenta genes para histonas (Figura 2a). Genes para histonas podem ser organizados em clusters repetidos em tandem de cinco intra genes (H1, H2A, H2B, H3 e H4), espaçados por sequências não-codificadoras de DNA, como nos genomas de *Drosophila melanogaster* (Lifton et al. 1977); do poliqueta *Chaetopterus variopedatus* (Del Gaudio et al. 1998) e da truta *Salmo gairdnerii* (Connor et al. 1984). Ainda assim, genes órfãos de histona são muito comuns (Childs 1981) e genes dispersos solitários de histonas também têm sido relatados (Maxson et al. 1983, Engel e Dodgson 1981). A coexistência dos dois tipos de organização também foi observada em alguns organismos, tais como o ouriço-do-mar (Maxson et al. 1983), *Xenopus laevis* (Ruberti et al. 1982) e no acridídeo *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero et al. 2009). Uma vez que não foram testadas as sequências para histonas H1, H2A e H2B, a presença de um grande bloco de H4 sem uma quantidade equivalente de sequências H3, observada no cromossoma 3 de *A. fasciatus* poderia ser devido à ausência de sequências H3 no aglomerado ou à presença apenas de H4, sem associação com outros tipos de genes para histonas.

O padrão observado para localização de genes das histonas H3 e H4 nos cromossomos A mostrou-se exatamente o mesmo nos três cariomorfos, resultado que aponta para a origem recente e comum dos três cariomorfos. Considera-se, portanto que a realização de análise filogenética molecular poderia ser bastante informativa sobre a datação do processo de diferenciação dos cariomorfos. O fato de não terem sido encontrados formas híbridas entre os três cariomorfos aqui analisados (Ferreira-Neto et al. 2012), embora estes sejam encontrados em simpatria no fluxo Água da Magdalena, não implica necessariamente que este seja o local de origem do processo diferenciação. Não pode ser descartada a idéia de que este riacho é componente de uma ampla rede

hidrográfica e, portanto, os cariomorfos poderiam ter tido origem distinta e se reunido após a diferenciação alopátrica.

A amplificação por DOP-PCR das sequências obtidas por microdissecção do cromossomo B produziu fragmentos de DNA com dimensões variando entre 200 e 600pb (Figura 3). A pintura cromossômica com sondas geradas a partir deste DNA mostrou sinais bastante visíveis de hibridação no cromossomo B, mas ausência completa de marcação visível em qualquer cromossomo do lote A (Figura 4).

É notável que um dos dois braços do cromossomo B mostrou sinal de hibridação visivelmente mais fraco do que o outro, o que sugere a existência de quantidades desiguais de sequências do mesmo DNA nos dois braços. Em princípio, a hibridação do conjunto das sequências microdissecadas e amplificadas por DOP-PCR a partir de um cromossomo, deveria resultar na hibridação completa e homogênea destas sondas com o cromossomo inteiro, a partir do qual eles foram microdissecados. No entanto, os resultados de FISH mostraram uma hibridização quase completa e não totalmente homogênea das sondas B com esse cromossomo, sugerindo um viés durante a geração da sonda. Com efeito, a DOP-PCR geralmente gera sondas de DNA enriquecidas em sequências repetitivas (Temin, 1974, 1995). Isto deve indicar que nossas sondas favorecem a rápida amplificação de segmentos de DNA repetitivo, que acabam por ter mais possibilidades de hibridação com o cromossomo devido à sua abundância numérica e à natureza competitiva da etapa de hibridação. A pintura cromossômica realizada com as sondas do cromossomo B não mostraram sequências A-B de DNA compartilhados, embora as experiências de FISH anteriores tenham indicado a presença de DNAr tanto nos cromossomos A quanto no B (Ferreira-Neto et al. 2012). Isso indica que a sonda-B obtida provavelmente não continha DNAr, ou que uma baixa prevalência do DNA de sondas marcadas não a tornou competitiva o suficiente para efeito de hibridação com os cromossomos A. Conseqüentemente, os resultados de pintura podem refletir o fato de que os cromossomos B contêm quantidades muito elevadas de sequências de DNA repetitivo.

O presente estudo apresenta algumas limitações inerentes às técnicas aplicadas em peixes, desde o fato de que as sequências de DNA da sonda B-específica utilizada para a pintura cromossômica pode ser de pequeno tamanho ou de baixo número de

nucleotídeos, tornando-se indetectável com a aplicação de FISH. Portanto, embora não tenham sido observados sinais visíveis de hibridação da sonda do cromossomo B com qualquer dos cromossomos do lote A, não pode ser descartada existência de homologia entre o cromossomo B e cromossomos do lote A em *A. fasciatus*, uma vez que pode haver compartilhamento de sequências de cópia única de DNA que são geralmente pouco representadas pelo método DOP-PCR utilizado para a amplificação de segmentos de DNA obtidos por microdissecção utilizado nesta investigação.

De qualquer forma, a ausência de hibridação da sonda B com os cromossomas A observada permanece informativa, uma vez que contrasta com observações descritas para várias espécies, onde cromossomos B partilham sequências de DNA repetitivo com os cromossomos do lote A no mesmo genoma. Tal fato já foi observado em *Vulpes vulpes* (Yang et al, 1999)., *Sapporensis podisma* (Bugrov et al, 2004), *Migratoria locusta* (Teruel et al, 2009, 2010.), *Plorans eyrepocnemis* (Cabrero et al Heredity 83, 435 - 439; Bakkali et al protoplasma 217,185-190), *Apodemus peninsulae* (Rubtsov et al, 2004), e *Podisma kanoi* (Brugov et al, 2007). Em todas estas espécies, a existência de sequências comuns de DNA entre os cromossomas A e B foi interpretada como uma evidência da origem intra-específica do cromossomo B a partir de um cromossomo do lote A. No caso presente, embora com aparente falta de sequências comuns entre os cromossomos B e A, a provável origem do cromossomo B parece apontar para uma origem interespecífica em *A. fasciatus* com cariomorfo $2n = 46$ cromossomos, com a ocorrência de algum evento de hibridização durante a história evolutiva deste cariomorfo. No caso do parasitóide *Nasonia vitripennis vespa*, a origem interespecífica foi comprovada pela razão sexual paterna (PSR), sendo o cromossomo B derivado de hibridação com uma espécie do gênero *Trichomalopsis* (McAllister e Werren, 1997). O cromossomo B encontrado em *A. fasciatus*, com a presença de DNAr, no seu braço longo e pelo fato notável de que todas as 12 fêmeas e 10 machos analisados apresentam cariomorfo 46 cromossomos, exatamente com um cromossomo B (Ferreira- Neto et al. de 2012), difere dos cromossomos B de outras espécies de *Astyanax*, como os de *A. scabripinnis* (Mestriner et al. 2000). Em contraste, o cromossoma B de *A. scabripinnis* está associado com uma proporção de sexo feminino polarizado (Vicente et al. 1996) e carrega um DNA repetitivo (As51) que também está presente em alguns cromossomos A (Pistune et al., 2011) .

A presença de apenas um cromossomo B em todos os indivíduos com cariomorfo de 46 cromossomos sugere que estes cromossomos chegaram à uma situação de estabilização. No entanto, um número de cromossomos ímpar não pode se estabilizar em um genoma diplóide, a menos que mecanismos especiais de eliminação ocorram durante a meiose em ambos os sexos. Um exemplo é o cromossomo restrito à linha germinal encontrado no peixe-zebra *Taeniopygia guttata*, onde todos os indivíduos carregam apenas uma cópia do cromossomo porque ocorre a eliminação destes durante a meiose masculina, na forma de micronúcleos, enquanto ocorre a unidade durante a meiose feminina (Pigozzi e Solari, 2005). A fim de desvendar os mecanismos possíveis para a estabilização do B em *A. fasciatus*, seria interessante analisar o comportamento do cromossomo B durante a meiose no cariomorfo com 46 cromossomos, incluindo a análise da presença de possíveis produtos meióticos anômalos, que são freqüentes em outros sistemas de cromossomos B como em gafanhotos (ver Teruel et al 2009b).

A possível presença de cromossomos B de diferentes origens, intra ou interespecífica em diferentes espécies de *Astyanax* faz deste gênero um material excelente para analisar o aparecimento de novos cromossomos, através da comparação de sequências de DNA parálogas entre cromossomas A e B. A diversidade intrigantemente alta que parece existir dentro do gênero *Astyanax*, com muitos complexos de espécies, conforme apontado ocorrer com *A. scabripinnis* por Moreira-Filho et al. (1991) e com *A. fasciatus* (Artoni et al., 2006), torna este gênero em um material rico de possibilidades para estudos comparativos.

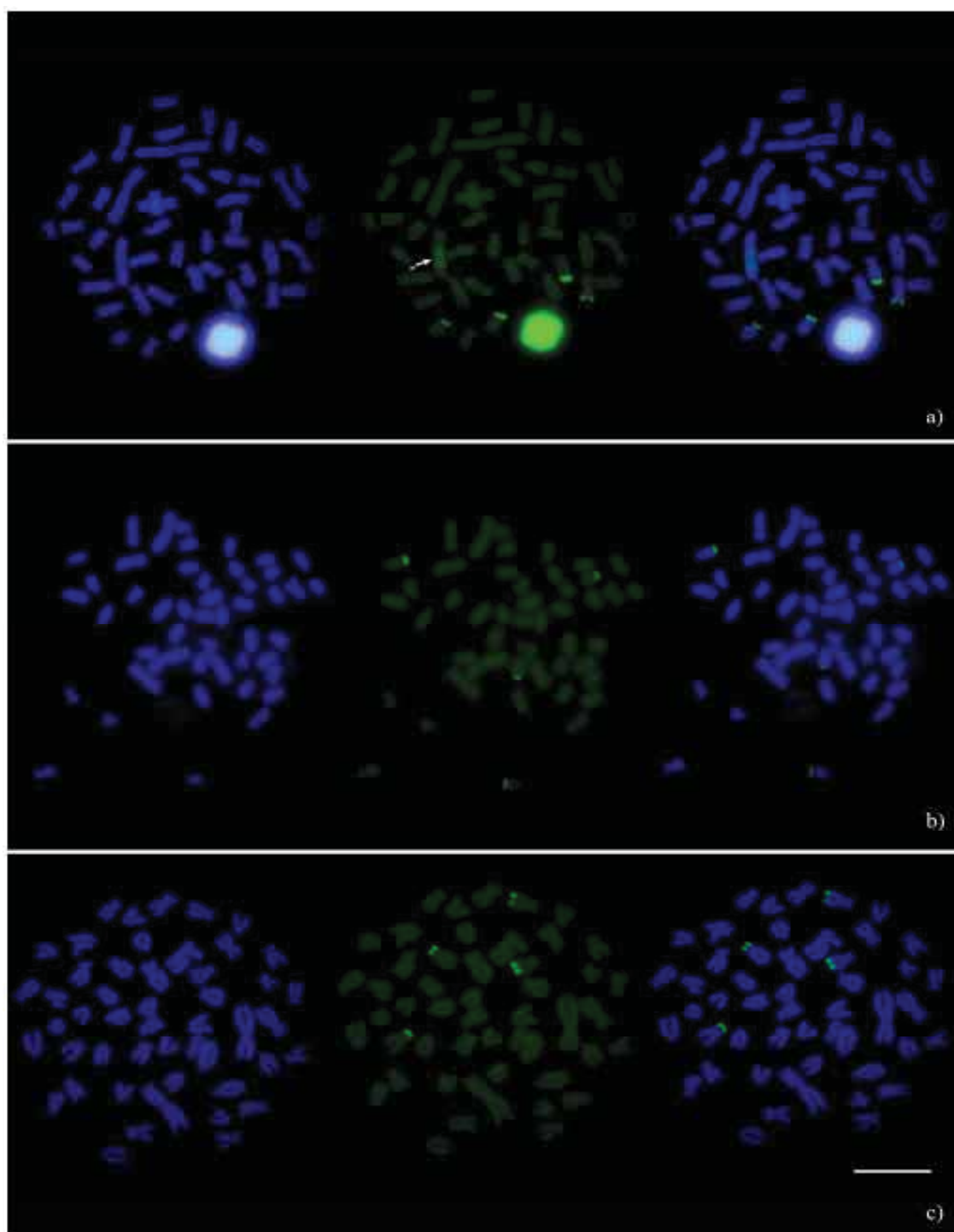


Figura 1. Metáfases de *Astyanax fasciatus* identificando os cariomorfos com 46 cromossomos (a); 48 cromossomos (b) e com 50 cromossomos (c), após coloração sequencial por DAPI, Cromomicina A3 e com ambas as colorações. Notar região intersticial fortemente fluorescente num cromossomo submetacêntrico, possivelmente o B, no cariomorfo com 46 cromossomos. Barra = 10 μ m.

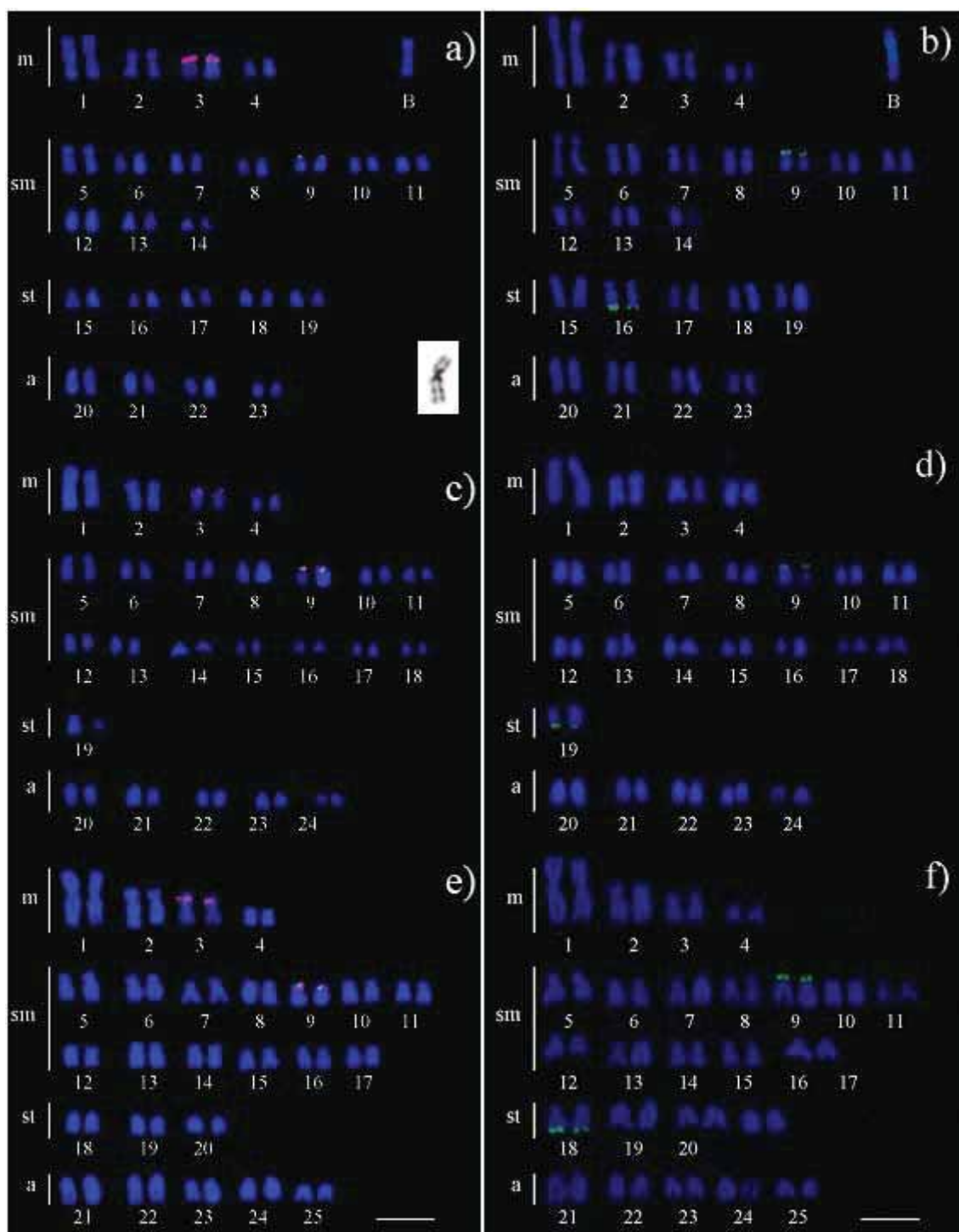


Figura 2. Cariótipos de *Astyanax fasciatus* mostrando cariomorfos com 46, 48 e 50 cromossomos (a,c,e, respectivamente), após FISH usando sondas para histonas H3 (verde) e H4 (vermelho) e coloração com Cromomicina-A3, em preparações dos cariomorfos com 46, 48 e 50 cromossomos (b,d,f, respectivamente). Em destaque (a), o padrão de bandas C do cromossomo B. Barra = 10μm.

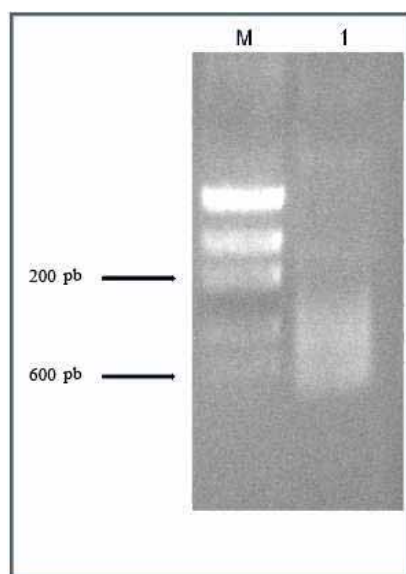


Figura 3: DOP-PCR do cromossomo B microdissectado de *A. fasciatus*.

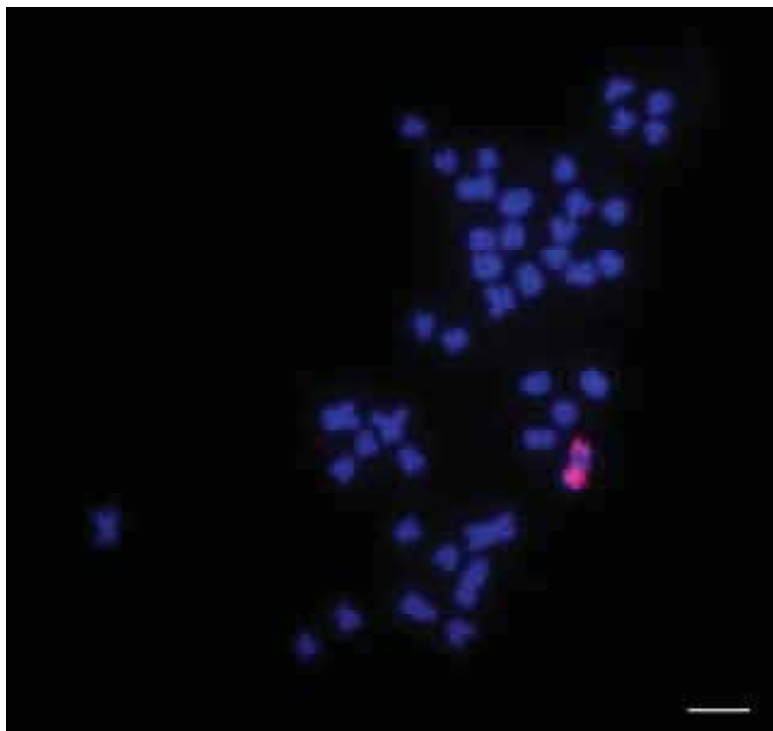


Figura 4. Metáfase de *Astyanax fasciatus* de indivíduo com cariomorfo de 46 cromossomos após FISH usando sonda obtida a partir da microdissecção total do cromossomo B. Barra de escala 10 μ m.

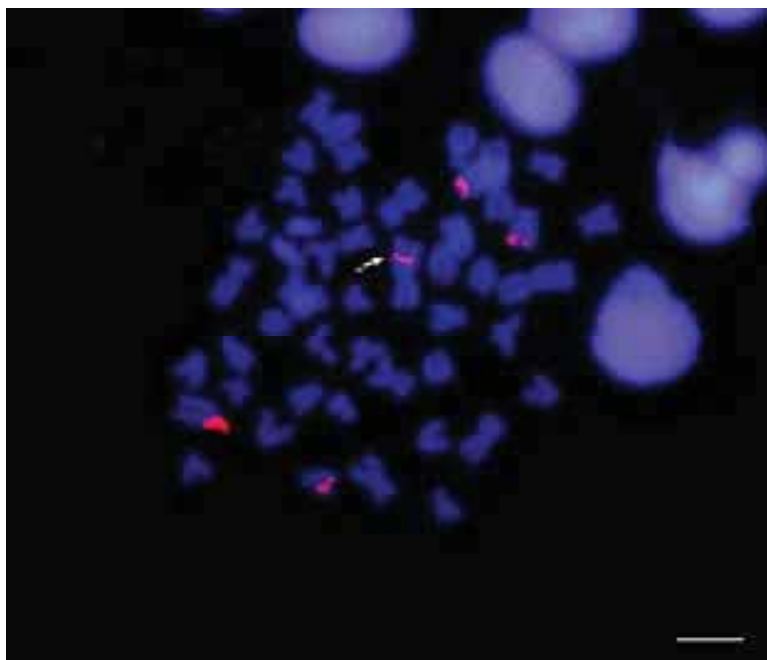


Figura 5. Metáfase de *Astyanax fasciatus* de indivíduo com cariomorfo de 46 cromossomos após FISH usando sonda As51. Observe a marcação no cromossomo B semelhante à marca obtida pela sonda de 18S. Barra = 10 μ m.

Capítulo 3

Deteção de homeologias cromossômicas em cariomorfos de *Astyanax fasciatus* (Characidae, Characiformes) com o uso de bandamentos cromossômicos e hibridação com sequências teloméricas.

Resumo

Estudos cromossômicos foram realizados em amostras de *Astyanax fasciatus* coletadas no ribeirão Água da Madalena, região de Botucatu, SP. Preparações cromossômicas foram submetidas a bandamentos C e R usando a técnica de bandamento de replicação pelo tratamento *in vivo* com 5-BrdU e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas (TTAGGG)_n. Os resultados até então obtidos com os marcadores moleculares e citogenética básica não identificaram a ocorrência de intercruzamentos envolvendo os exemplares dos diferentes tipos cromossômicos encontrados, que evidenciaram cariomorfos com 46, 48 e 50 cromossomos, sem fórmulas híbridas entre os mesmos. Porém, se os diferentes citótipos compartilham uma série de homologias, como evidenciado na análise dos marcadores cromossômicos, também são encontradas diferenças que poderiam ser consequência de rearranjos cromossômicos complementares, evidenciadas pelo bandamento R, decorrente do processo de diferenciação estabelecido e ocasionando a especiação entre os exemplares de diferentes citótipos. A distribuição da heterocromatina foi variável em alguns pares cromossômicos dos três citótipos e a hibridação com sondas teloméricas não evidenciou sítios intersticiais que poderiam indicar eventos de fusão recente.

Introdução

Peixes do gênero *Astyanax* têm demonstrado uma considerável diversidade cariotípica, apresentando variações numéricas e estruturais de cariótipos que os tornam um modelo interessante para o estudo dos processos envolvidos na diferenciação e diversificação de espécies neste grupo de organismos. Os números diplóides e fundamentais ($2n$ e NF), aliados a outros marcadores cromossômicos e estudos taxonômicos, têm permitido a elaboração de inferências evolucionárias sobre estes peixes.

Assim como o bandamento C, o padrão de incorporação de bandas R mostra-se como uma importante opção na identificação da homeologia de cromossomos em peixes (Almeida-Toledo et al. 1988) e permite o estudo de unidades de replicação e detecção de possíveis rearranjos cromossômicos, proporcionando, assim, evidências da evolução da estrutura dos cromossomos (Almeida-Toledo et al. 1988; Daniel-Silva e Almeida-Toledo 2005). Da mesma forma, a aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sequências teloméricas fornece novas evidências para a evolução cromossômica, uma vez que os telômeros são regiões de extrema importância para a manutenção da estabilidade cromossômica e sua integridade (Kipling 1995).

O uso de hibridização *in situ* com sonda de DNA telomérico (TTAGGG) pode revelar sítios cromossômicos intersticiais contendo sequências teloméricas (Meyne et al. 1990, Garagna et al. 1997, Pagnozzi et al. 2002, Nanda et al. 2002, 2008), indicando a ocorrência recente de rearranjos cromossômicos (Phillips e Reed 1996) como fusões (Holmquist e Dancis 1979).

O presente estudo visa utilizar protocolos de bandamento C e R e a hibridação *in situ* de sequências teloméricas em preparações cromossômicas de *Astyanax fasciatus* a fim de detectar possíveis rearranjos cromossômicos e fornecer informações que conduzam a uma melhor compreensão do processo de diversificação e evolução cariotípica desta espécie.

Materiais e Métodos

Foram coletadas e analisadas noventa amostras de *A. fasciatus* (56 fêmeas e 34 machos), encontradas em simpatria e sintopia no córrego Água da Madalena, Botucatu, SP, Brasil (22 ° 59'23 "S 48 ° 25'31" W). Os espécimens estudados foram fixados em formol 10% e preservados em álcool 70% e após a identificação, foram depositados no Museu de Biologia e Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Preparações cromossômicas e bandeamento

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células da porção anterior do rim, utilizando a técnica de secagem convencional ao ar (Foresti et al., 1981). Análise da heterocromatina constitutiva (bandas C) seguiu o procedimento básico proposto por Sumner (1972), com adaptações mínimas. O bandeamento R foi feito a partir da incorporação de 5-Bromodeoxiuridina, com os animais sendo injetados previamente com solução de BrdU 0,1 ml/10g de massa corporal a partir de solução de 5-BrdU a 25 µg/ml, 5 a 6 horas antes do sacrifício dos animais, sendo as preparações coradas com Giemsa por 5 minutos.

O mapeamento de sítios de sequências de DNA telomérico em cromossomos metafásicos foi realizado utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente, de acordo com o procedimento estabelecido pela Pinkel et al. (1986), com adaptações. As sondas utilizadas foram obtidas a partir de primers (TTAGGG) 5 e (CCCTAA) 5, e foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Sciences) por PCR, sendo os sinais de hibridação detectados com anti-digoxigenina-rodamina.

Os cromossomos metafásicos foram contrastados com DAPI e analisados em microscópio óptico (Olympus BX61), sendo as imagens capturadas usando o programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan et al. (1964) e estes foram classificados como cromossomos dos tipos metacêntrico (M), (sm) submetacêntrico, (st)

subtelocêntricos e acrocêntricos (a), sendo dispostos no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Resultados e Discussão

A aplicação da técnica de bandamento C revelou a presença de blocos bem definidos de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas e teloméricas de diversos cromossomos do complemento cariotípico, sendo encontrados mais cromossomos marcados na região telomérica do braço longo de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos no cariomorfo com 46 cromossomos (Figura 1a) e 48 cromossomos (Figura 1b), sendo que poucas blocos heterocromáticos foram identificados nos cromossomos do cariomorfo com 50 cromossomos (Figura 1c), corroborando resultados anteriores descritos nos trabalhos de Justi (1993), Heras (1998) e Centofante (2003). O macrocromossomo B encontrado nos exemplares do cariomorfo com 46 cromossomos de *A. fasciatus* no presente estudo apresentaram-se parcialmente heterocromáticos. Esta característica tem apresentado diferentes particularidades nas espécies, uma vez que em estudos realizados por Schmid et al., (2006), a heterocromatina constitutiva pôde ser visualizada pelo bandamento C ao longo de todo o cromossomo B de *Alburnus alburnus*, do mesmo modo que no macrocromossomo B identificado em *Astyanax scabripinnis* por Maistro et al. (2001), o qual também mostrou-se totalmente heterocromático.

O papel da heterocromatina na diversificação cromossômica pode estar relacionado a polimorfismos cromossômicos, como observado em *Diplodus bellotti* (Amores et al., 1993) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani et al., 2000); a diferentes composições moleculares desta porção do genoma, como identificado em *Astyanax scabripinnis* (Souza et al., 1996) e *Leporinus desmotes* (Margarido e Galetti 2000); à diferenciação e formação de cromossomos sexuais, como observado em diversas espécies do gênero *Leporinus* (Galetti e Foresti, 1987), *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta et al. 1992), espécies do gênero *Characidium* (Maistro et al., 1998; Centofante et al.,

2001) e *Triportheus* (Artoni et al., 2001). Pode estar relacionado também à ocorrência de cromossomos supranumerários, como observado em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti et al., 1989; Hashimoto et al., 2012), *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreata et al., 1993), *Prochilodus lineatus* (Oliveira et al., 1997; Jesus et al., 2003, Artoni et al., 2006), *Astyanax scabripinnis* (Neo et al., 2000; Mestriner et al., 2000) e *Characidium* (Pansonato-Alves et al., 2010; Santos et al., 2012).

A análise dos padrões de bandamento R revelou um padrão de diferenciação longitudinal nos cromossomos do lote A, também observado no cromossomo B de *A. fasciatus* do córrego Água da Madalena (Figuras 2a,b,c). Esta técnica tem sido aplicada para a obtenção de bandamento em várias espécies de peixes (Delany e Bloom, 1984; Almeida-Toledo et al., 1988; Giles et al., 1988; Almeida-Toledo et al. 1998; Gold et al., 1990; Hellmer et al., 1991; Sánches et al., 1993; Bertollo et al., 1997; Daniel-Silva e Almeida-Toledo 2005), entre outros.

O macrocromossomo B identificado nesta população de *A. fasciatus* é similar em tamanho ao primeiro par do cariótipo (Figura 1a), resultado também observado em *Astyanax scabripinnis* (Maistro et al., 1994) e em diferentes populações de espécies deste gênero (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1992; Fauaz et al., 1994; Santos et al., 2012).

O mapeamento das regiões teloméricas (GGGTTA) apresentou marcas em todos os telômeros, incluindo os telômeros dos cromossomos B; contudo, nenhum sinal intersticial foi observado, tanto nos cromossomos do lote A quanto no cromossomo B (Figuras 3a,b,c). Uma análise citogenética realizada por Meyn et al. (1990) em 100 espécies de vertebrados a fim de localizar sítios ITS, envolveu a relação de várias espécies de mamíferos como primatas do gênero *Eulemur* (Garagna et al., 1997; Go et al., 2000), de peixes (Albuín et al., 1996) e de aves (Nanda et al., 2002). Foi constatado que, nos casos de fusão em que as sequências teloméricas não são perdidas, os cromossomos resultantes irão apresentar sítios intersticiais pericentroméricos. Quando os telômeros são eliminados por quebras cromossômicas, as sequências intersticiais não estão presentes no local da fusão, como demonstrado em ratos

selvagens que sofreram fusões cromossômicas Robertsonianas (Garagna et al., 2001).

Neste contexto pode ser considerado que as regiões de fusões representariam possíveis pontos de fissão em que telômeros novos poderiam aparecer, sendo formados por repetições teloméricas pré-existentes, estabilizando o rearranjo cromossômico durante a evolução (Ruiz-Herrera et al., 2008). Em peixes estas sequências estão presentes geralmente apenas nas regiões terminais havendo, contudo, em alguns casos a presença de sítios intersticiais (ITS), indicando processos recentes de fusão cromossômica (Holmquist e Dancis, 1979). No presente estudo, os três diferentes cariomorfos não mostraram nenhuma evidência de sítios intersticiais, o que poderia indicar a ocorrência de fusões cromossômicas com a perda destas sequências, ou ainda, sem a perda das sequências, mas seguida da sua inativação pelo não funcionamento das proteínas associadas (Zakian, 1995) ou pela inativação da telomerase (Blasco et al., 1997), que regula a atividade funcional desta região do genoma, como eventos associados com a inativação do telômero. Isto poderia sugerir a ocorrência de um rearranjo diferente, como eventos de fissão, sendo que esta reorganização teria acontecido com tempo suficiente para que as sequências fossem perdidas.

Para propor a ocorrência de homologia entre diferentes pares de cromossomos dos três cariomorfos encontrados em *A. fasciatus* e confirmar o resultado obtido por hibridação *in situ* com sondas teloméricas, foi feita a análise de bandamento R, pois esta técnica permite a identificação do padrão de replicação de cromossomos homólogos em diferentes espécies (Dutrilaux, 1979). Esta abordagem é adotada para confirmar o resultado obtido pela hibridação *in situ* de sequências teloméricas, permitindo verificar a ocorrência de homeologias entre pares cromossômicos dos três cariomorfos. A correspondência completa de suas bandas indicaria serem herdados de um ancestral comum, sem mudanças detectáveis, como visto em espécies de outros grupos (Hellmer et al., 1991; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2005). Em um estudo feito anteriormente (Ferreira-Neto et al., 2012), na mesma população descrita neste trabalho, porém com diferentes marcadores, é proposto que os três cariomorfos encontrados já teriam se diferenciado a ponto

de serem considerados como indicadores de espécies diferentes, porém, ainda imperceptíveis morfologicamente. A análise do presente estudo permitiu a verificação de similaridade entre os pares 24 e 3 do citótipo com 48 cromossomos, que correspondem às regiões p e q do par 6 do citótipo com 46 cromossomos. Os pares 16 e 24 do citótipo com 50 cromossomos correspondem, respectivamente, às regiões p e q do par 12 do citótipo com 48. Desta forma, o cromossomo B poderia ter sido originado pela amplificação de segmentos de outro cromossomo.

O presente estudo é parte de uma análise mais abrangente envolvendo componentes do que poderia ser considerado o complexo de espécies que formariam a espécie atualmente identificada como *Astyanax fasciatus*, de ocorrência no córrego Água da Madalena, Botucatu, SP, utilizando-se de dados de citogenética molecular. A análise citogenética realizada indica que as bandas heterocromáticas e eucromáticas dos cromossomos obtidas pelo tratamento com BrdU, bem como a hibridação *in situ* realizada com sondas teloméricas podem ser relacionados como bons marcadores citogenéticos para estes organismos, sendo indicativos para estudos comparativos.

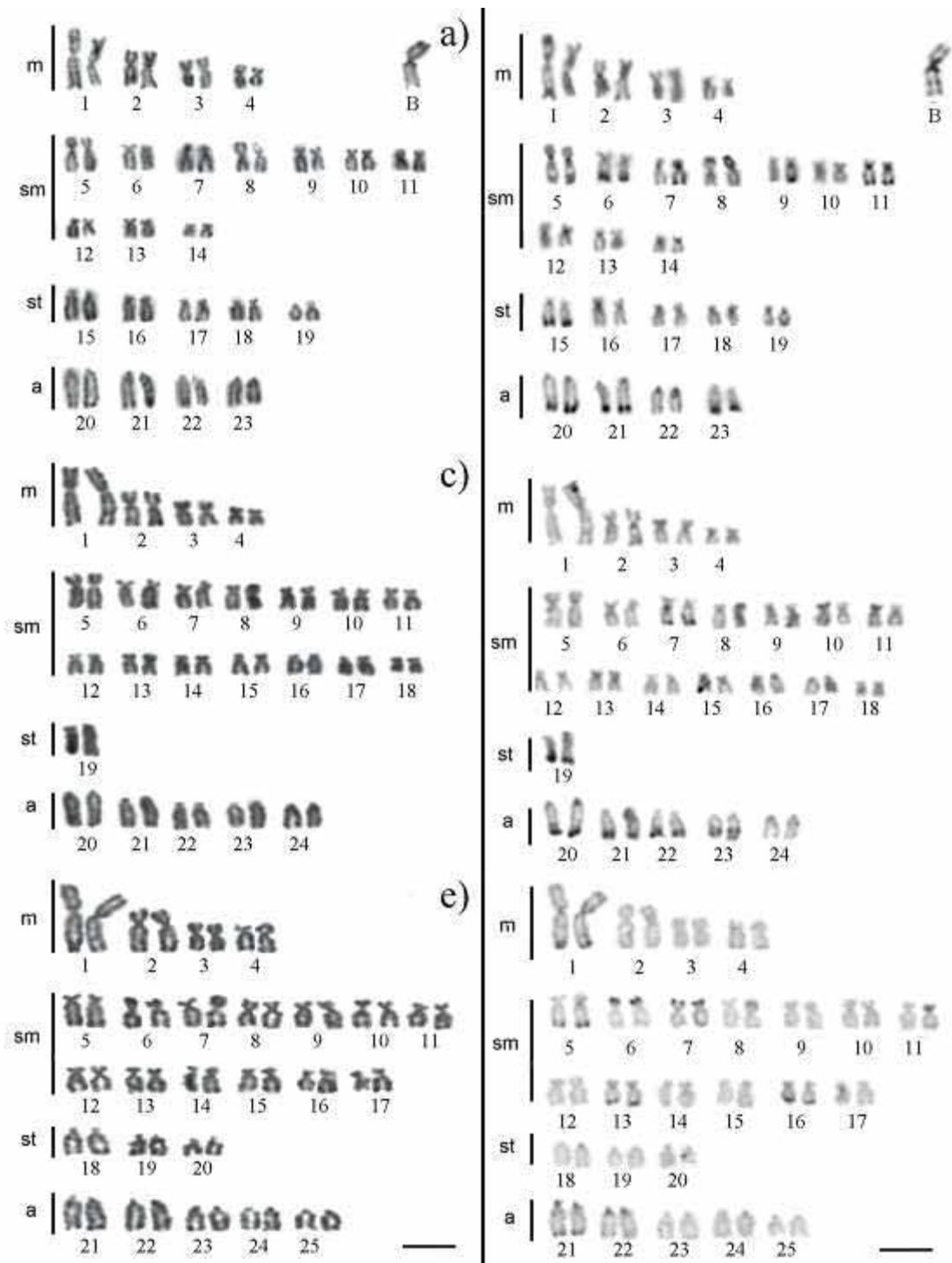


Figura 1: Cariótipo dos cariomorfos de *Astyanax fasciatus* com 46, 48 e 50 cromossomos (1a,c,e, respectivamente) com coloração por Giemsa e bandamento C (1b,d,f, respectivamente). Em detalhe (b), o cromossomo B após tratamento para bandamento C. Barra = 10µm.

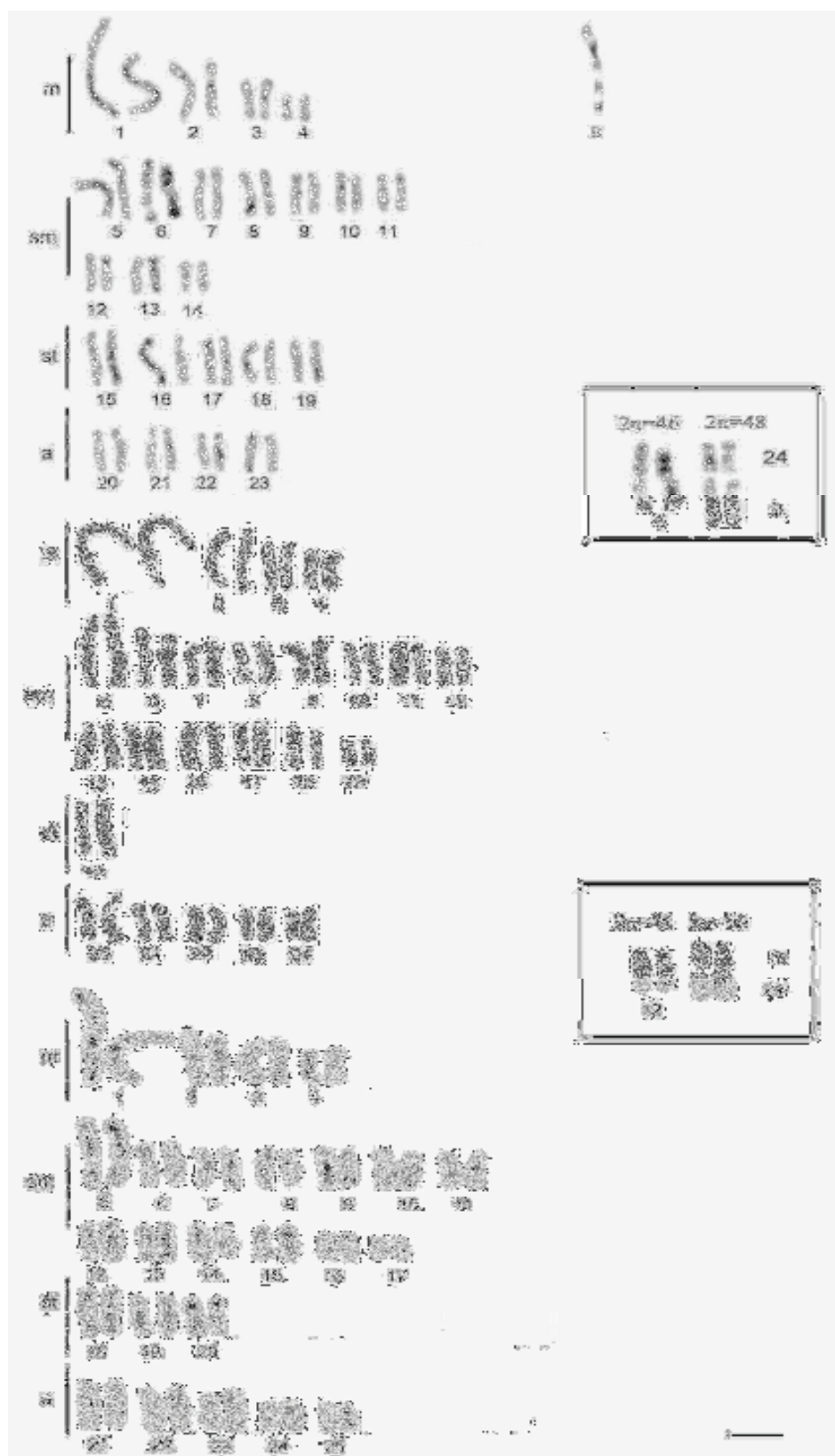


Figura 2. Cariótipo dos cariomorfos de *Astyanax fasciatus* com 46, 48 e 50 cromossomos (2 a,b,c), após bandamento R. Barra = 10µm.

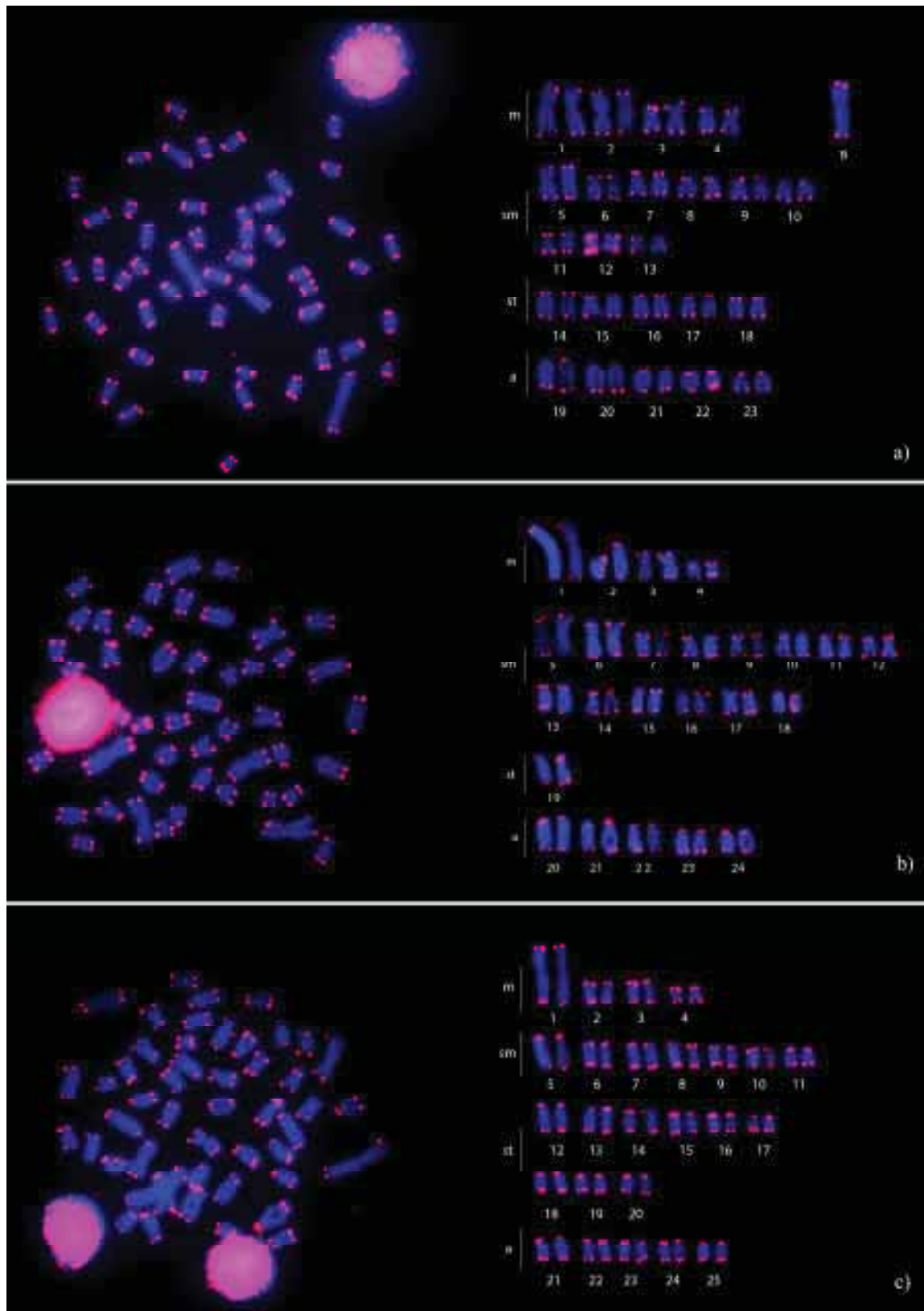


Figura 3. Metáfases e cariótipos dos cariomorfos de *A. fasciatus* com 46, 48 e 50 cromossomos (2 a,b,c), após FISH usando sonda telomérica. Barra = 10µm.

5. Considerações finais

A análise citogenética dos exemplares de *Astyanax fasciatus* do presente estudo revelou a existência de três diferentes cariomorfos, que se apresentaram com 46, 48 e 50 cromossomos, além da presença de um cromossomo supranumerário mitoticamente estável apenas nos indivíduos portadores do cariomorfo com 46 cromossomos. O mecanismo determinante da estabilização do cromossomo B em populações do córrego Água da Madalena, portanto, parece ser bastante complexo e sua elucidação requer novas investigações sobre a dinâmica populacional destas entidades biológicas e estudos sobre a origem e o sobre o processo de transmissão deste elemento genômico. As características do cromossomo supranumerário encontrado nesta amostra de *A. fasciatus* parecem comuns aos cromossomos B descritos em outros representantes do gênero *Astyanax*. Tal semelhança morfológica apoiaria a hipótese de uma origem comum destes cromossomos em *Astyanax* (Moreira-Filho et al. 2001).

O mapeamento físico do DNAr mostrou uma conservação notável de sítios do DNAr 5S nos diferentes cariomorfos encontrados, enquanto os sítios do DNAr 18S mostraram-se numerosos e bastante diversificados. A coloração de cromossomos metafásicos pela Prata revelou que o segmento contendo o gene ribossomal 18S identificado a partir da utilização de sondas específicas pela técnica de FISH no cromossomo B é provavelmente inativo, reforçando o que parece constituir-se numa característica generalizada dos cromossomos B, já relatada anteriormente ocorrer em várias espécies filogeneticamente distantes. A freqüente identificação de maior número de clusters de DNAr pelo método da hibridação in situ de sondas 18S do que marcações geradas pelo método Ag-NORs de reação com prata sugere a existência de sítios inativos deste tipo de DNAr na maioria das células. Nos cariomorfos estudados, o par de cromossomos que se mostrou constante para os diferentes tipos de marcas identificatórias destes genes e que apresentaria, portanto, a região organizadora de nucléolo, seria provavelmente o primeiro par submetacêntrico.

A ausência de formas cromossômicas intermediárias, a presença de cromossomos B em apenas um desses cariomorfos (com 46 cromossomos) e a

ausência de heteromorfismo aparente para o cromossomo 20 sugerem que os três cariomorfos não revelam a ocorrência de processos de hibridação no ambiente estudado, reforçando a possibilidade de que estes três cariomorfos corresponderiam a três espécies crípticas, apoiando, assim, a hipótese de que *A. fasciatus* constitua um complexo de espécies, onde várias entidades já identificadas e outras ainda em fase de descrição possam estar atualmente incluídas sob o nome de *A. fasciatus* (Artoni et al. 2006).

A análise dos resultados obtidos com o uso do bandamento R, realizado com a finalidade de confirmar os dados da hibridação *in situ* por sondas teloméricas, permite propor que os três diferentes cariomorfos se originaram a partir de processos de fissão ou fusão cromossômica ocorridos nas formas primitivas originais e se diferenciaram com o tempo nos cariomorfos hoje encontrados. A ausência de marcações intersticiais nos cromossomos submetidos a hibridações com sondas teloméricas poderia ser indicativo da ocorrência de perda de segmentos teloméricos durante o processo de modificação cromossômica. Não pode ser descartada, contudo, a hipótese de que estes segmentos, embora presentes num estágio inicial do processo de diferenciação podem ter passado por modificações e perdido as características específicas destes segmentos genômicos, não sendo, portanto, detectados pelas técnicas aplicadas. A inexistência de formas híbridas entre os três cariomorfos na amostra analisada também constitui um reforço para a hipótese de que estas já poderiam ter se diferenciado ao nível de espécie e que, embora vivendo em simpatria e sintopia, não estariam incorrendo em processos de hibridação.

A análise molecular a partir de sondas histônicas H3 e H4 aponta para características ainda conservadas neste grupo de espécies e estas sequências não apresentaram nenhum tipo de relação cromossômica com as sequências dos demais marcadores e nem com os cromossomos B.

Por fim, a produção de sondas do cromossomo B com o uso da microdissecção e a pintura cromossômica permitiu verificar que o mesmo não possui homologia qualquer dos cromossomos do complemento A, sendo

marcado somente o cromossomo B quase totalmente, uma vez que este também mostrou ser parcialmente heterocromático pelo bandamento C. Tal resultado parece indicar uma origem independente deste elemento supranumerário com relação ao genoma dos indivíduos do cariomorfo com 46 cromossomos.

6. Conclusões

As análises de citogenética moleculares mostraram-se eficazes para o estudo evolutivo da espécie e permitiram identificar características comuns herdadas de forma ancestral e que se mantêm intactas após a diferenciação, ao mesmo tempo em que modificações estruturais ocorridas nos cromossomos destes indivíduos levaram à formação de cariomorfos específicos e independentes, que poderiam ser identificadas como espécies crípticas, compondo, assim, um complexo de espécies para *Astyanax fasciatus*.

7. Referências Bibliográficas

- Albig W, Kardalinos E, Drabent B, Zimmer A, Doenecke D (1991) Isolation and characterization of two human H1 histone genes within cluster of core histone genes. *Genomics*, 10: 940–948.
- Abuín M, Clably C, Martínez, P (1996) A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome* 39: 671-679
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Oliveira C (1993) A citogenética de peixes no Brasil. Paper presented at 10th Congresso Brasileiro de Ictiologia, 9-13 February, São Paulo, São Paulo.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho AS (1988) An early stage of sex chromosomedifferentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae). *Genome*. v30 (1,Suppl): 132.
- Almeida Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In *Chromosome Today*.; 13: 169-182.
- Amores A, Martinez G, Reina J, Alvarez MC (1993) Karyotype, C-banding, and AgNOR analysis in *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes). Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome* 36: 672-675.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA (1993) Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW sex chromosome system, B-chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Micro-lepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 215-220.
- Anleltner JE, Haymer DS (1992) Y-enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Chromosoma* 101: 271-278.
- Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC, Vicari MR, Bertollo LAC (2006) *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, 4(2):197-202, 2006.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006) Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-284.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Fontes MS (1997) Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n = 40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 237-242.

Britski HÁ, Sato Y, Rosa ABS (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143p.

Blasco MA, Lee H, Hande MP, Samper E, Landsorp PM, Depinho RA, Greider CW (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91: 25-34

Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, Andreenkova OV, Rubtsov NB (2004) Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet Genome Res.*; 106: 284-288.

Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, et al. (2007) DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res.*; 15: 315-325

Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A, Camacho JP M (1997) Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research* 5: 194–198.

Cabrero J, Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research* 16:595-607. Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: gregory TR (ed) *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, pp 223-286.

Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research.*; 17: 397-404.

Camacho JPM (1993) Polymorphisms and geographic distribution. *Anais da 1st B Chromosome Conference*. Madri, Espanha, p.2-3.

Cannizzaro LA (1996) Chromosome microdissection: a brief overview. *Cytogenet Cell Genet* 74:157–160.

Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM (2000) Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chrom. Res.* 8: 627-634.

Centofante L, Bertollo LAC, Miyazawa CS, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetraodonidae). *Cytology* 68:283-288.

Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric Characium fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*, 138(3): 213-218.

Cestari AN (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 (1994) The effect of background selection against deleterious alleles on weakly selected, linked variants. *Genet. Res.* 63:213–228.

Childs G, Maxson R, Cohn RH, Kedes L (1981) Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. *Cell.*; 23: 651-663.

Cole CJ, Levans CR (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev.* 3: p 102.

Connor W, Mezquita J, Winkfein RJ, States JD, Dixon GH (1984) Organization of the histone genes in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *J. Mol. Evol.* 20: 227–235.

Crampton DS, Souza ACP, Carvalho JR, Nagamachi CY (2008) Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*, 9: 75-85.

Daniel-Silva MFZ, Almeida-Toledo LF (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenet Genome Research* 109:497-501.

del Gaudio R, Potenza N, Stefanoni P, Chiusano ML, Geraci G (1998) Organization and nucleotide sequence of the cluster of five histone genes in the polychaete worm *Chaetopterus variopedatus*: First record of a H1 histone gene in the phylum Anellida. *J. Mol. Evol.* 46: 64–73.

Delany ME, Bloom SE (1984) Replication banding patterns in the chromosomes of the rainbow trout. *J. Hered.* 75: 431-434.

Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C, Volobouev V (2002) “Ag-NORs” are not always true NORs: New evidence in mammals. *Cytogenetics and Genome Research* 98:75-77.

Doolittle WF, Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature.* 284: 601-603.

Dutrillaux B (1979) Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (prosimian) to man. *Hum. Genet.*, 48: 251-314.

Egozcue J (1971) Técnicas em citogenética. Ed. ESPAXS, Barcelona, 144 pp

Engel JD, Dodgson JB (1981) Histone genes are clustered but not tandemly repeated in the chicken genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2856–2860

Fauaz G, Vicente VE, Moreira-Filho O (1994) Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brasilian Journal of Genetics* 17:157-163.

Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F (2012) Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations *CompCytogen* 6(1): 29–40.

Ferro DAM, Neo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001) Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica* 110:55-62.

Flavell RB, Bennett MD, Smith JB, Smith DB (1974) Genome size and proportion of repeated sequence DNA in plant. *Biochem. Genet.* 12: 257-269

Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 31:137-144.

Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using *in vitro* short-term treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.

Fukui K, Nakayama S (1996) *Plant Chromosome: Laboratory Methods*. CRC Press, Boca Ranton.

Galetti-Júnior PM, Foresti F (1987) Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationship in the phylogeny of the group. *Bras. J. Genet.* 10: 135-140.

Garagna S, Ronchetti E, Mascheretti S, Crovella S, Formenti D, Rumpher YS, Romanini MGM (1997) Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. *Chromosome Res.*, v.5, p. 487-491.

Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Canpanna E (2001) Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 171-175.

Géry J (1977) *Characoids of the World*. T.F.H. Publications, Inc.Ltda, 672 p

Giles V, Thode G, Alvarez MC (1988) Early replication bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaeniformes). *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 80-83.

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

Go Y, Rakotoarisoa G, Kawamoto Y, Randrianjafy A, Koyama N (2000) PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosome Research*, 8: 57-65.

Guerra M (1988) *Introdução a Citogenética Geral*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.

Graham GJ (1995) Tandem genes and clustered genes. *J. Theor. Bio.* 175: 71-87

Kipling (1995) *The Telomere*. Oxford University Press Inc, New York.

Hadjiolov AA (1985) The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs*. Springer-Verlag: New York.; 263 p.

Hassanane MS, Chaudhary R, Chowdhary BP (1998) Microdissected bovine X chromosome segment delineates homoeologous chromosomal regions in sheep, goat and buffalo. *Chromosome Res.* 6: 213-217.

Hatanaka T, Galetti PM Jr (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal rDNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*, v.270, p.313-322.

Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101, p.14812-14817.

Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008) Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res.*; 121: 55-58.

Hellmer A, Voiculescu I, Schempp W (1991) Replication banding studies in two cyprinid fishes. *Chromosoma* 99: 524-531.

Heras MP (1998) *Estudos citogenéticos em Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de alguns rios do Brasil. São Carlos (PR) Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.

Hogg ID, Hebert PDN (2004) Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*, v.82, p.749-754.

Holmquist GP, Dancis B (1979) Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 4566-4570.

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

Hurst GD, Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Sci*, v.272, p.1525-1534.

Itoh Y, Kampf K, Pigozzi MI, Arnold AP (2009) Molecular cloning and characterization of the germline-restricted chromosome sequence in the zebra finch. *Chromosoma* 118:527–536.

Jesus CM, Moreira-Filho O (2003) Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 56:281-287.

Jin SM, Toledo V (1975) Citogenética de *Astyanax fasciatus* e *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). *Ciência Cultural* 27:1122-1124.

Justi AJ (1993) Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil.

Katagiri T, Asakawa S, Minagawa S, Shimizu N, Hirono I, Aoki T (2001) Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. *Anim Genet* 32:200-204 .

Kazazian HHJ, Moran JV (1998) The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet* 22: 130.

Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49-63.

Kraemer C, Schmidt ER (1993) The sex determination region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma* 102: 553–562.

Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic Cell Genet* 26:36-40.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.

Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS (1977) The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 1047–1051.

Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q (2003) The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18: 65-66.

Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 338, 348-350

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1992) Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genética* 87: 101-106.

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C (1994) New occurrence of a macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae) *Rev. Bras. de Genet.* 17:153-156.

Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2001) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica*, 110, 177-183.

Martins C, Galetti Jr. PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*.7:363-367.

Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *In: Focus on Genome Research*, C. R. Williams (ed.). *Nova Science Publishers, Hauppauge, NY., pp. 289-318.*

Margarido VP, Galetti-Jr. PM (2000) Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto v. 23, n. 3, p.560-573.

Maxson R, Cohn R, Kedes L (1983) Expression and organization of histone genes. *Ann Rev Gen.*;17: 239-277.

Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent J (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat. Genet.* 1: 24-8.

Messier W, Li SH, Stewart CB (1996) The birth of microsatellites. *Nature (Lond.)* 381: 483.

Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* an isochromosome. *Heredity* 85: 1-9.

Metcalf CJ, Bulazel K, Ferreri GC, Schroeder-Reiter E, Warner G, Rens W, Obergfell C, Eldridge MDB, O'Neill RJ (2007) Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. *Genetics*. 177:2507–2517.

Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyziz RK (1990) Distribution of non telomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, v. 99, p. 3-10.

Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Souza ACP, Carvalho JR Jr., Nagamachi CY (2007) The callichthyid catfish, *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling species complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 3(1): 17.

Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC (1997) Macro and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, v. 127, p. 249-253.

Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Toledo-Filho SA (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I Karyotypic variability. *Caryologia* 36:235–244.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Genetics and Molecular Biology* 14:331-357.

Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia* v. 66, p. 59-64.

Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC (2004) B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenetics and Genome Research* 106:230-234.

Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Toledo-Filho SA (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) I Karyotypic variability. *Caryologia* 36:235–244

Moritz C, Cicero C (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2: 354.

Mühlmann-Diaz MC, Christian AT, Bedford JS. (1995) Chromosome microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Würzburg, Germany. Nelson JS (1994) *Fishes of the world*. Wiley, USA, 3rd edition, 600 pp.

Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M (2002) Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, 111: 215-227.

Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M (2008) Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetics Genome Res.*, 122: 396-400.

Neo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* v. 108, p. 211-215.

Novak A, Kruskic M, Ludoski M, Jurukovski V (1994) Rapid method for obtaining high-quality chromosome banding in the study of hematopoietic neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 74, 109-114.

Oliveira C, Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res.*; 6: 205-11.

Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988b) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia.* 41: 227-236.

Orgel LE, Crick FHC (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604–607.

Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y (2002) Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenetics Genome Res.* 98: 278-284.

Pansonato Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes, Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(1): 77-86.

Pazza R, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2005) *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil - Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. *Caryologia* 58:339-344.

Pazza R, Kavalco SAF, Bertollo LAC (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of 18S and 5S ribosomal genes in sympatric Karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetics and Genome Research* 112:313-319.

Pazza R, Kavalco SAF, Penteado PR, Kavalco KF, Almeida-Toledo LF (2008) The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): A multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology* 72:2002-2010.

Pendás AM, Mórán P, García-Vasquez E (1993) Ribosomal rna genes are interspersed throughout heterochromatin chromosome arms in Atlantic salmon. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63:128-130.

Phillips RB, Reed KM (1996) Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.

Pigozzi MI, Sciurano RB, Solari AJ (2005) Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *Biocell*;29:195– 203.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA v. 83, p.2934-2938.

Pistone HFM (2010) Citogenética molecular de *Astyanax scabripinnis* Characidae, Incertae sedis) com ênfase no cromossomo B. Dissertação de Mestrado (Programa de PósGraduação em Biologia Evolutiva). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR.

Poletto AB, Ferreira IA, Martins C (2010) The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. BMC Genetics 11:1. Salvador LB, Moreira-Filho O (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Heredity 69: 50-56.

Porto Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and populational diversity of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brasil. J. Genet.* 20: 377-380.

Rocon-Stange EA, Almeida-Toledo LF (1993) Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 16: 601-615.

Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV, et al. (2004) Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res.*; 106: 289-294.

Ruberti I, Fragapane P, Pierandrei-Amaldi P, Beccari E, Amaldi F, Bozzoni I (1982) Characterization of histone genes isolated from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* genomic libraries. *Nucleic Acids Res.* 10: 1544–1550.

Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostinho M, Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res.*, 122: 219-228.

Salvador LB, Moreira-Filho O (1992) B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* 69: 50-56.

Sambrook J, Russell I (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainsville, New York, USA.

Sánchez L, Abuín M, Amaro R (1993) Cytogenetic characterization of the AS cell line derived from the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cytogenet. Cell Genet.* 64: 35-38.

Scheel JJ (1973) Fish chromosome and their evolution. Interval Report os Danmarks Akvarium. 22p.

Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*.; 58: 307-324.

Singer MF (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*; 76: 67- 112.

Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (2004) B chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenetics and Genome Research* 106:257-263.

Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS (2008) Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24(5): 625–641. doi: 10.1111/j.1096-0031.2008.00210.x

Stitou S, Díaz de la Guardia, Jiménez R, Burgos M (2000) Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Research* 8:305-311.

Smith PJ, McVeagh SM, Steinke D (2008) DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J Fish Biol.* 72: 464-471.

Sittman DB, Chiu IM, Pan CJ, Cohn RH, Kedes LH, Marzluff WF (1981) Isolation of two clusters of mouse histone genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul;78(7):4078–4082.

Souza IL, Moreira-Filho O (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax ax scabripinis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60:1-11.

Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM (1996) Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Revista Brasileira de Genética, Riberião Preto*, v. 19, n. 3, p. 405-410.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research.*; 75: 304-306.

Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays.*; 29: 288-299.

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2007) Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, *Chromosome Research* 15pp. 755–765.

Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research* 17: 11-18.

Tigano C, Rocco L, Ferrito V, Costagliola D, Pappalardo AM, Stingo V (2004) Chromosome mapping and molecular characterization of ribosomal RNA genes in *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Genetica* 121:95-100.

Turner BJ, Diffoot N, Rasch EM, Souza IL, Moreira-Filho O (1995) Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. *Cytologia*, 60:1-11.

Vari RP (1983) Phylogenetic relationship of the families Curimatidae, Prochilodontidae, *Anostomidae* and *Chilodontidae* (Pisces, Characiformes). *Smithsonian contributions to Zoology* 378: 1-58.

Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho PM (1996) Sex-ratio distortion associated with the presence of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 74: 70-75.

Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica.*; 134: 311-317.

Zakian VA (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, 270: 1601-1607.

Ward RD, Grewe PM (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. (Ed. R. Gary, Carvalho, J. Tony and Pitcher). Chapman and Hall, pp. 300-325.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360: 1847-1857.

Wasko AP, Galetti PM (2000) Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genet. Mol. Biol.*, vol. 23, no. 1 p. 135-138.

Weitzman SH, VARI RP (1998) Characins and their allies, In: JR. Paxton and WN. Eschmeyer (eds.), *Encyclopedia of fishes*. 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA, p. 101-107.

White MJD (1954) *Animal cytology and evolution*, 1st and 2nd ed. Cambridge University Press.

Yang FO, Brien PC, Milne BS et al. (1999) A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 62: 189Y202.

Yonenaga-Yassuda Y (2004) Contribuição da FISH à Citogenética de Mamíferos e Répteis. Cap.4, p.89-114. FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.

